

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA**



**EFFECTO DEL ESTRÉS PRENATAL SOBRE LA  
RESPUESTA METABÓLICA Y EL RECAMBIO  
CELULAR EN EL EJE HIPOCAMPO-HIPOTÁLAMO-  
HIPOFISARIO.  
RESPUESTA A UNA DIETA RICA EN SACAROSA.**

Memoria para optar al grado de Doctor en la UAM de la licenciada

**EVA BAQUEDANO CABALLERO**

**DIRECTORES:**

**Prof. Dra. Laura María Frago Fernández**

**Prof. Dr. Jesús Argente Oliver**

**Madrid, 2014**





Facultad de Medicina  
Departamento de Pediatría

Doña LAURA MARÍA FRAGO FERNÁNDEZ, Doctora en Biología por la Universidad Autónoma de Madrid y Profesor contratado doctor del Departamento de Pediatría de la Facultad de Medicina en la Universidad Autónoma de Madrid.

**CERTIFICA:**

Que Dña. Eva Baquedano Caballero, Licenciada en Biología por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado bajo su dirección el trabajo de investigación titulado: “Efecto del estrés prenatal sobre la respuesta metabólica y el recambio celular en el eje hipocampo-hipotálamo-hipofisario. Respuesta a una dieta rica en sacarosa”, para optar al grado de Doctor.

Considero que dicho trabajo es satisfactorio y reúne las condiciones necesarias para ser presentado como Tesis Doctoral en el Departamento de Pediatría de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que así conste, expido el presente certificado en Madrid, a diez de Marzo de dos mil catorce.

Fdo.: Prof. Dra. Laura María Frago Fernández  
Directora de la Tesis





Facultad de Medicina  
Departamento de Pediatría

Don JESÚS ARGENTE OLIVER, Catedrático y Director del Departamento de Pediatría de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, y Jefe de Servicio de Pediatría del Hospital Infantil Universitario Niño Jesús.

CERTIFICA:

Que Dña. Eva Baquedano Caballero, Licenciada en Biología por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado bajo su dirección el trabajo de investigación titulado: “Efecto del estrés prenatal sobre la respuesta metabólica y el recambio celular en el eje hipocampo-hipotálamo-hipofisario. Respuesta a una dieta rica en sacarosa”, para optar al grado de Doctor.

Considero que dicho trabajo es satisfactorio y reúne las condiciones necesarias para ser presentado como Tesis Doctoral en el Departamento de Pediatría de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que así conste, expido el presente certificado en Madrid, a diez de Marzo de dos mil catorce.

Fdo.: Prof. Dr. Jesús Argente Oliver  
Director de la Tesis



Esta Tesis ha sido financiada por una Beca de Formación de Personal Investigador (FPI: ref. BES-2009-020394) del Ministerio de Ciencia e Innovación, por los proyectos del Ministerio de Ciencia e Innovación (BFU2008-02950-C03-03 y BFU2011-27492) y por la Universidad Autónoma de Madrid-Comunidad de Madrid (CCG2008-UAM/SAL4451), por el CIBER de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CB06/03; Instituto de Salud Carlos III de Madrid), por el Instituto de Investigación Sanitaria-Princesa y por la Fundación de Endocrinología y Nutrición.





**“Conserva lo que tienes, olvida lo que te duele, lucha por lo que quieres,  
valora lo que posees, perdona a los que te hieren y disfruta a los que te  
aman.”**

**Bob Marley**



**A mis padres y a mi hermana, Sara**



## **RESUMEN Y ABSTRACT**



## **RESUMEN**

Durante distintos periodos de la vida de un individuo como son el periodo prenatal, el perinatal, la infancia y la adolescencia se produce un incremento en la plasticidad de los sistemas de estrés, siendo éstos muy sensibles a estímulos estresantes externos. Por ello, cuando se produce un evento estresante durante alguno de estos periodos, se ven afectadas las funciones comportamentales y fisiológicas como son el crecimiento y el metabolismo a largo plazo. Además, un estrés subcrónico gestacional induce alteraciones duraderas en el eje hipocampo-hipotálamo-hipofisario debido al aumento de glucocorticoides circulantes que tienen un fuerte impacto en la programación prenatal y modifica la función metabólica, incluyendo la respuesta a cambios metabólicos futuros.

El objetivo de esta tesis doctoral radica en investigar si la respuesta metabólica a una dieta rica en sacarosa introducida en la edad adulta está afectada por el estrés prenatal y si estos efectos incluyen modificaciones en el recambio celular. Además, se estudió si estos efectos son diferentes en machos y hembras.

Para ello, se llevaron a cabo tres modelos experimentales distintos, en los cuales se sometió a ratas Wistar o ratonas C57BL/6 preñadas a estrés por restricción de movimiento (3 veces/día) durante la última semana gestacional y a una dieta rica en sacarosa en la edad adulta en uno de los modelos. Se analizaron la respuesta metabólica y el recambio celular en las distintas áreas del eje hipocampo-hipotálamo-hipofisario en distintas etapas de la vida, embriones E17, adultos jóvenes y adultos.

Los resultados aquí obtenidos nos indican que tanto el estrés prenatal como la ingesta de sacarosa inducen cambios en la respuesta metabólica y en los niveles de muerte celular y de proliferación, siendo gran parte de estos cambios diferentes en machos y hembras. Además, el estrés prenatal condiciona la respuesta de la ingesta de sacarosa, incrementando o evitando los efectos de la sacarosa. Finalmente cabe destacar que el estrés prenatal induce distintos efectos en el recambio celular dependiendo de la edad de los animales en el momento del estudio.

Por tanto, un ambiente adverso durante la gestación induce alteraciones duraderas en el metabolismo y en el recambio celular en el eje hipocampo-hipotálamo-hipofisario en la descendencia que condiciona la respuesta a una dieta rica en sacarosa.

**PALABRAS CLAVE:** estrés prenatal, sacarosa, eje hipocampo-hipotálamo-hipofisario, respuesta metabólica, muerte celular, proliferación.





**ABSTRACT**

During different periods of the life of an individual such as the prenatal period, the perinatal period, childhood and adolescence the plasticity of stress systems is increased and they also are very sensitive to external stressors. Therefore, when a stressful event occurs during any of these periods behavioral and physiological functions such as growth and metabolism can be affected at long term. In addition, a subchronic gestational stress leads to permanent modifications in the hippocampus-hypothalamus-pituitary axis probably due to the increase in circulating glucocorticoids known to have a strong impact on prenatal programming and modifies metabolic function, including the response to future metabolic changes.

The aim of this doctoral thesis was to investigate if the metabolic response to a sucrose enriched diet introduced in adulthood was affected by prenatal stress and if these effects include modifications of cell turnover. Moreover, we studied if this response was different in males and females.

For this purpose, three different experimental models were performed, in which pregnant Wistar rats or C57BL/6 mice were subjected to restraint stress (3 times/day) during the last week of gestation and a sucrose enriched diet was given to adult mice in one of the experimental models. Metabolic response and cell turnover were analyzed in different areas of the hippocampus-hypothalamus-pituitary axis at different stages of life, including E17 embryos, young adults or adults.

The results obtained here indicate that both prenatal stress and sucrose intake induce changes in the metabolic response and on cell death and proliferation levels, with many of these changes being different in males and females. In addition, the prenatal stress response affects sucrose intake and, increases or abolishes the effects of sucrose. Finally prenatal stress induces different effects on cell turnover depending on the age of the animals at the time of the study.

Therefore, an adverse environment during gestation induces long term changes in systemic metabolism and cell turnover in the hippocampus-hypothalamus-pituitary axis in offspring that determines the response to a sucrose enriched diet.

**KEY WORDS:** prenatal stress, sucrose, hippocampus-hypothalamus-pituitary axis, metabolic response, cell death, proliferation.



## **ABREVIATURAS**



## ABREVIATURAS

A lo largo del texto se emplean las abreviaturas del Sistema Internacional de Unidades (SI) de medida. Además se incluyen las que a continuación se describen.

**Δ:** Diferencia

**nX:** n veces concentrado

**%:** Porcentaje

**Abs:** Absorbancia

**ACTH:** Hormona adrenocorticotropa

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**ADNc:** ADN copia o complementario

**ADP:** Adenosín 5'-difosfato

**AgRP:** Péptido relacionado con la proteína agouti

**AIF:** Factor inductor de apoptosis

**AKT:** Proteína quinasa B

**AMPC:** Adenosín 3',5'-monofosfato cíclico

**ANOVA:** Análisis de la varianza

**Apaf-1:** Factor activador de proteasas apoptóticas

**ARN:** Ácido ribonucleico

**ARNm:** Ácido ribonucleico mensajero

**AVP:** Arginina-Vasopresina

**β:** Beta

**Bak:** antagonista/asesino homólogo de Bcl-2

**Bax:** Proteína X asociada a Bcl-2

**Bcl-2:** Proteína del linfoma de células B

**Bcl-xl:** Proteína extralarga del linfoma de células B

**BH:** Homología con Bcl-2

**Bid:** Proteína con dominio de interacción con Bcl-2

**Bim:** Mediador de muerte que interactúa con Bcl-2

**Bioplex:** Inmunoensayo múltiple en suspensión

**BSA:** Albúmina de suero bovino

**Ca<sup>2+</sup>:** Iones calcio

**CART:** Tránsito regulado por cocaína y anfetamina

**CREB:** Proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc

**CRH:** Hormona liberadora de corticotropina

**C-T:** Colesterol total

**cx:** Corteza

**Cyt c:** Citocromo c

**dATP:** Desoxiadenosina trifosfato

**DED:** Dominios efectores de muerte

**DISC:** Complejo inductor de muerte

**dNTPs:** Desoxirribonucleótidos trifosfato

**E0, 12 ó 17:** Embriones de 0, 12 ó 17 días, respectivamente

**EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético

**e.e.m.:** Error estándar de la media

**EGF:** Factor de crecimiento epidermal  
**ELISA:** Enzimoinmunoanálisis  
**FADD:** Proteínas con dominio de muerte asociado a Fas  
**FASL:** Ligando del receptor FAS  
**FSH:** Hormona foliculoestimulante  
**GABA:** Ácido gamma-amino butírico  
**GAPDH:** Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa  
**GFAP:** Proteína ácida fibrilar glial  
**GH:** Hormona de crecimiento  
**GR:** Receptor de glucocorticoides  
**HCl:** Cloruro de Hidrógeno  
**HDL:** Lipoproteína de alta densidad  
**HDL-c:** HDL colesterol  
**HEPES:** Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazineetanosulfónico  
**HHH:** Eje hipocampo-hipotálamo-hipofisario  
**HHHS:** Eje hipocampo-hipotálamo-hipófiso-suprarrenal  
**hip:** Hipocampo  
**HRP:** Peroxidasa de rábano  
**IEMA:** Ensayo inmunoenzimométrico  
**IGF-I, -II:** Factor de crecimiento similar a insulina tipo I y II  
**IGF-IR:** Receptor de IGF-I  
**IRS:** Sustrato del receptor de insulina  
**Kcal:** Kilocalorías  
**KDa:** Kilodalton  
**LDL:** Lipoproteína de baja densidad  
**LDL-c:** LDL colesterol

**LH:** Hormona luteinizante  
**M ó mM:** Molar ó milimolar  
**MAPK:** Quinasas activadas por mitógenos  
**MC3R, MC4R:** Receptor de melanocortina 3 y 4  
**MCH:** Hormona concentradora de melanina  
**MDB:** Tampón para desalar la membrana de las columnas de extracción  
**Mm:** Ratón común  
**MR:** Receptor de mineralocorticoides  
**n:** Número de animales  
**Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>:** Ortovanadato sódico  
**NaCl:** Cloruro de Sodio  
**NaF:** Fluoruro de Sodio  
**NPY:** Neuropeptido Y  
**NS:** no significativo  
**OMS:** Organización Mundial de la Salud  
**P0 ó P21:** Día postnatal 0 ó 21  
**p:** Fosforilación o fosfo-proteína  
**PCNA:** Antígeno nuclear de proliferación celular  
**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa  
**pH:** Potencial de hidrógeno  
**PI3K:** Fosfatidilinositol 3' quinasa  
**PMSF:** Fluoruro de fenilmetilsulfonilo  
**POMC:** Proopiomelanocortina  
**PRL:** Prolactina

**PTEN:** Gen homólogo de la fosfatasa y la tensina

**PVDF:** Fluoruro de polivinilideno

**PVN:** Núcleo paraventricular del hipotálamo

**RA1:** Tampón de lisis

**RA2:** Tampón para inactivar la ADNasa I y lavar la membrana de las columnas

**RA3:** Tampón de lavado

**RIPA:** Tampón de radioinmunoprecipitación

**Rn:** Rata

**RPE:** Tampón de lavado

**RT:** Transcripción inversa

**RT-PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real

**RW1:** Tampón de lavado

**SDS:** Dodecil sulfato sódico

**SNC:** Sistema Nervioso Central

**SRY:** Región determinante del sexo del cromosoma Y

**t.a.:** Temperatura ambiente

**t-Bid:** Proteína con dominio de interacción con Bcl-2 truncada

**TG:** Triglicéridos

**TSH:** Hormona estimulante del tiroides o tirotropina

**T-TBS:** Tampón Tris salino + Tween

**Tuj-1:**  $\beta$ -III tubulina

**TNF- $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral alfa

**TNFR1:** Receptor de TNF- $\alpha$

**TRADD:** Proteínas con dominio de muerte asociado a TNF- $\alpha$

**UCP-1:** Proteína desacoplante 1

**UV:** Ultravioleta

**vs:** Versus

**Vf:** Volumen final

**VLDL:** Lipoproteínas de muy baja densidad

**VLDL-c:** VLDL colesterol

**XIAP:** Proteína inhibidora de la apoptosis ligada al cromosoma





## ÍNDICE



## ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.    El estrés.....	3
2.    El eje Hipocampo-Hipotálamo-Hipófiso-Suprarrenal .....	4
2.1. Activación del eje Hipocampo-Hipotálamo-Hipófiso-Suprarrenal y su relación con el estrés.....	6
3.    El eje Hipocampo-Hipotálamo-Hipofiso-Suprarrenal y la regulación del balance energético.....	10
4.    Dieta en sacarosa y metabolismo.....	14
5.    El recambio celular .....	16
<b>II. HIPÓTESIS .....</b>	<b>27</b>
<b>III. OBJETIVOS.....</b>	<b>31</b>
<b>IV. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>35</b>
1.    Reactivos.....	37
2.    Animales y modelos de experimentación in vivo .....	37
2.1. Animales de experimentación .....	37
2.2. Modelos de experimentación.....	38
2.2.1. Modelo de estrés prenatal .....	38
2.2.1.1. Diseño experimental .....	38
2.2.1.2. Frotis vaginal .....	39
2.2.1.3. Sacrificio y recogida de las muestras.....	39
2.2.2. Modelo de estrés prenatal con cambio de dieta .....	40
2.2.2.1. Diseño experimental .....	40
2.2.2.2. Control de peso, ingesta y niveles de glucosa en sangre .....	41
2.2.2.3. Sacrificio y recogida de las muestras .....	41
2.2.3. Modelo de embriones de 17 días estresados prenatalmente .....	42
2.2.3.1. Diseño experimental .....	42
2.2.3.2. Genotipado de los embriones .....	42
2.2.3.3. Sacrificio y recogida de las muestras .....	43
3.    Extracción de los distintos tejidos .....	43
3.1. Extracción y disección del cerebro.....	43
3.1.1. Extracción del encéfalo.....	43
3.1.2. Disección del cerebro para la obtención del hipotálamo, el hipocampo y la corteza.....	43

3.1.3. Disección de la hipófisis.....	45
<b>3.2. Disección de los distintos tipos de tejido adiposo .....</b>	<b>45</b>
3.2.1. Disección del tejido adiposo subcutáneo.....	45
3.2.2. Disección del tejido adiposo visceral .....	46
3.2.3. Disección del tejido adiposo marrón .....	46
<b>4. PREPARACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS.....</b>	<b>46</b>
<b>4.1. Obtención de la fracción proteica total .....</b>	<b>46</b>
4.1.1. Reactivos de lisis .....	46
4.1.1.1. Tampón RIPA (Tampón de radioinmunoprecipitación) .....	46
4.1.1.2. Tampón de Inmunoprecipitación.....	46
4.1.2. Método.....	47
<b>4.2. Cuantificación de la concentración de proteína .....</b>	<b>47</b>
<b>5. Elisa para la determinación de la muerte celular.....</b>	<b>47</b>
<b>6. Inmunodetección de proteínas .....</b>	<b>48</b>
6.1. Reactivos .....	48
6.2. Método .....	48
<b>7. Análisis de ARN mensajeros .....</b>	<b>51</b>
<b>7.1. Extracción de ARN con el reactivo TriReagent .....</b>	<b>51</b>
7.1.1. Reactivos .....	51
7.1.2. Método.....	51
<b>7.2. Extracción de ARN con el Kit Illustra RNAspin.....</b>	<b>51</b>
7.2.1. Reactivos .....	51
7.2.2. Método.....	52
<b>7.3. Extracción de ARN con el reactivo Quiazol.....</b>	<b>52</b>
7.3.1. Reactivos .....	52
7.3.2. Método.....	53
<b>7.4. Cuantificación de la concentración de ARN.....</b>	<b>53</b>
<b>7.5. Transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa.....</b>	<b>53</b>
7.5.1. Transcripción inversa (RT).....	53
7.5.2. Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (RT-PCR).....	54
<b>8. Determinaciones bioquímicas en suero .....</b>	<b>55</b>
8.1. Ensayo Inmunoenzimométrico (IEMA) para la determinación del Factor de Crecimiento similar a la Insulina tipo I (IGF-I).....	55
8.2. Análisis colorimétrico para la detección de los niveles séricos de triglicéridos (TG), colesterol total (C-T), HDL colesterol (HDL-c), LDL colesterol (LDL-c), proteínas totales, lípidos totales y glicerol.....	56
8.3. Inmunoensayo múltiple en suspensión (Tecnología Luminex; BioPlex) .....	59
<b>9. ÍNDICES ATEROGÉNICOS.....</b>	<b>59</b>
<b>10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....</b>	<b>59</b>

<b>V. RESULTADOS .....</b>	<b>61</b>
<b>1. Efecto del estrés prenatal en edad embrionaria y en edad adulta .....</b>	<b>63</b>
<b>1.1. Efecto del estrés prenatal en el hipocampo y el hipotálamo de embriones de ratón de 17 días, machos y hembras .....</b>	<b>63</b>
1.1.1. Efecto del estrés prenatal sobre el peso corporal de la madre y el número de embriones .....	63
1.1.2. Efecto del estrés prenatal sobre los niveles de ARNm del receptor de glucocorticoides.....	64
1.1.3. Efecto del estrés prenatal sobre los neuropéptidos hipotalámicos implicados en la regulación de la ingesta.....	64
<b>1.2. Efecto del estrés prenatal en la respuesta metabólica a una dieta rica en sacarosa introducida en la etapa adulta en ratones macho y hembra.....</b>	<b>67</b>
1.2.1. Efecto del estrés prenatal sobre el peso corporal de los animales durante las nueve semanas anteriores al cambio de dieta .....	67
1.2.2. Efecto del estrés prenatal y de la ingesta de sacarosa durante 2 semanas en la etapa adulta sobre el peso corporal y la ganancia de peso en machos y hembras .....	68
1.2.3. Efecto del estrés prenatal y de la ingesta de sacarosa durante 2 semanas en la etapa adulta sobre la ingesta .....	69
1.2.4. Efecto del estrés prenatal y de la ingesta de sacarosa durante 2 semanas en la etapa adulta sobre los depósitos de tejido adiposo en machos y hembras.....	72
1.2.5. Efecto del estrés prenatal y de la ingesta de sacarosa durante 2 semanas en la etapa adulta sobre los niveles séricos de hormonas metabólicas.....	74
1.2.6. Efecto del estrés prenatal y de la ingesta de sacarosa durante 2 semanas en la etapa adulta sobre los niveles séricos de hormonas implicadas en estrés .....	77
1.2.7. Efecto del estrés prenatal y de la ingesta de sacarosa durante 2 semanas en la etapa adulta sobre los niveles séricos de colesterol, triglicéridos, proteínas y lípidos totales y glicerol.....	77
1.2.8. Efecto del estrés prenatal y de la ingesta de sacarosa durante 2 semanas en la etapa adulta sobre los neuropéptidos hipotalámicos implicados en la regulación de la ingesta.....	82
1.2.9. Efecto del estrés prenatal y de la ingesta de sacarosa durante 2 semanas en la etapa adulta sobre los niveles de ARNm de la proteína desacoplante UCP-1 implicada en el control del balance energético .....	83
<b>2. Estudio del recambio celular en el eje hipocampo-hipotálamo-hipofisario .....</b>	<b>85</b>
<b>2.1. Efecto del estrés prenatal en el recambio celular en el hipocampo y el hipotálamo en ratas macho adultas .....</b>	<b>85</b>
2.1.1 Efecto del estrés prenatal sobre los niveles de muerte celular en el eje hipocampo-hipotálamo-hipofisario .....	85
2.1.2. Efecto del estrés prenatal sobre la proliferación celular en el eje hipocampo-hipotálamo-hipofisario .....	86
2.1.3. Efecto del estrés prenatal sobre las vías de muerte celular en el eje Hipocampo-Hipotálamo-Hipofisario.....	86
2.1.4. Efecto del estrés prenatal sobre la vía de la calpaína en el eje Hipocampo-Hipotálamo-Hipofisario.....	87

2.1.5. Efecto del estrés prenatal sobre los niveles de IGF-I en el eje Hipocampo-Hipotálamo-Hipofisario y los niveles de IGF-I circulante.....	88
2.1.6. Efecto del estrés prenatal sobre proteínas reguladoras de la apoptosis en el eje Hipocampo-Hipotálamo-Hipofisario .....	89
2.1.7. Niveles de ARNm de las hormonas hipofisarias .....	92
2.1.8. Niveles proteicos de GFAP y Tuj-1 en el hipocampo y el hipotálamo .....	92
<b>2.2. Efecto del estrés prenatal en el recambio celular en el hipocampo y el hipotálamo de embriones de ratón de 17 días.....</b>	<b>93</b>
<b>2.2.1. HIPOCAMPO.....</b>	<b>93</b>
2.2.1.1. Efecto del estrés prenatal sobre los niveles de muerte celular y proliferación en el hipocampo de embriones de ratón de 17 días, machos y hembras .....	93
2.2.1.2. Efecto del estrés prenatal sobre las vías de muerte celular en el hipocampo de embriones de ratón de 17 días, machos y hembras.....	94
2.2.1.3. Efecto del estrés prenatal sobre las proteínas reguladoras de la apoptosis en el hipocampo de embriones de ratón de 17 días, machos y hembras.....	95
2.2.1.4. Efecto del estrés prenatal sobre los niveles de ARNm de IGF-I y de su receptor en el hipocampo de embriones de ratón de 17 días, machos y hembras. ....	97
2.2.1.5. Efecto del estrés prenatal sobre los niveles de GFAP y Tuj-1 en el hipocampo de embriones de ratón de 17 días, machos y hembras.....	98
<b>2.2.2. HIPOTÁLAMO.....</b>	<b>99</b>
2.2.2.1. Efecto del estrés prenatal sobre los niveles de muerte celular y proliferación en el hipotálamo de embriones de ratón de 17 días, machos y hembras .....	99
2.2.2.2. Efecto del estrés prenatal sobre las vías de muerte celular en el hipotálamo de embriones de ratón de 17 días, machos y hembras .....	100
2.2.2.3. Efecto del estrés prenatal sobre las proteínas reguladoras de la apoptosis en el hipotálamo de embriones de ratón de 17 días, machos y hembras.....	101
2.2.2.4. Efecto del estrés prenatal sobre los niveles de ARNm de IGF-I y de su receptor en el hipotálamo de embriones de ratón de 17 días, machos y hembras .....	102
2.2.2.5. Efecto del estrés prenatal sobre los niveles de GFAP y Tuj-1 en el hipotálamo de embriones de ratón de 17 días, machos y hembras .....	103
<b>2.3. Efecto del estrés prenatal en el recambio celular en el hipocampo y el hipotálamo de ratones macho y hembra alimentados con una dieta rica en sacarosa introducida en la etapa adulta.....</b>	<b>104</b>
<b>2.3.1. HIPOCAMPO.....</b>	<b>104</b>
2.3.1.1. Efecto del estrés prenatal sobre los niveles de muerte celular y proliferación en el hipocampo de ratones macho y hembra alimentados con una dieta rica en sacarosa introducida en la etapa adulta.....	104

---

---

2.3.1.2. Efecto del estrés prenatal sobre las vías de muerte celular en el hipocampo de ratones macho y hembra alimentados con una dieta rica en sacarosa introducida en la etapa adulta.....	106
2.3.1.3. Efecto del estrés prenatal sobre proteínas reguladoras de la apoptosis en el hipocampo de ratones macho y hembra alimentados con una dieta rica en sacarosa introducida en la etapa adulta.....	108
2.3.1.4. Efecto del estrés prenatal sobre GFAP y Tuj-1 en el hipocampo de ratones macho y hembra alimentados con una dieta rica en sacarosa introducida en la etapa adulta .....	110
<b>2.3.2. HIPOTÁLAMO .....</b>	<b>111</b>
2.3.2.1. Efecto del estrés prenatal sobre los niveles de muerte celular y proliferación en el hipotálamo de ratones macho y hembra alimentados con una dieta rica en sacarosa introducida en la etapa adulta. ....	111
2.3.2.2. Efecto del estrés prenatal sobre las vías de muerte celular en el hipotálamo de ratones macho y hembra alimentados con una dieta rica en sacarosa introducida en la etapa adulta.....	113
2.3.2.3. Efecto del estrés prenatal sobre proteínas reguladoras de la apoptosis en el hipotálamo de ratones macho y hembra alimentados con una dieta rica en sacarosa introducida en la etapa adulta.....	115
2.3.2.4. Efecto del estrés prenatal sobre GFAP y Tuj-1 en el hipotálamo de ratones macho y hembra alimentados con una dieta rica en sacarosa introducida en la etapa adulta .....	117
<b>VI. DISCUSIÓN .....</b>	<b>119</b>
<b>VII. CONCLUSIONES .....</b>	<b>151</b>
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>155</b>





## **INTRODUCCIÓN**



## **INTRODUCCIÓN**

### **1. El estrés**

La supervivencia de un organismo vivo depende del mantenimiento de la homeostasis ante constantes cambios, acontecimientos o situaciones estresantes tanto intrínsecas como extrínsecas (Weinstock, 1997). El estrés se define como cualquier condición que perturba la homeostasis fisiológica de un organismo y puede ser visto desde dos puntos de vista, como causa o como efecto (Vanitallie, 2002). La respuesta a estrés se caracteriza por adaptaciones físicas y de comportamiento, incluyendo un incremento en la cognición, la analgesia, la gluconeogénesis, la lipólisis y la inhibición de la reproducción (Bose y cols., 2009).

Existen distintos tipos de estrés dependiendo de la frecuencia y la duración del estímulo. Así se puede distinguir entre estrés agudo, cuando el estímulo estresante se presenta una sola vez y estrés crónico. El estrés crónico a su vez se puede dividir en intermitente si el estímulo se repite diariamente durante un determinado número de días o continuo si el individuo está permanentemente expuesto al estímulo (Marti y Armario, 1998). En situación de estrés agudo tiene lugar la activación del eje hipocampo-hipotálamo-hipofisario-suprarrenal induciendo un incremento de las hormonas de estrés, los glucocorticoides. Estas hormonas median la adaptación del organismo a la situación estresante y regulan la terminación de la respuesta al estrés a través de un mecanismo de retroalimentación negativa (De Kloet y Reul, 1987; Magariños y cols., 1987). Sin embargo, en situaciones de estrés crónico este mecanismo de retroalimentación se desregula dando lugar a distintos síndromes como son ansiedad y desórdenes depresivos (Sapolsky y cols., 2000). Por ello, es importante comprender como una situación estresante puede dar lugar a una enfermedad, ya que, el organismo reacciona de diferente manera para adaptarse y protegerse en determinadas situaciones, pero estos mecanismos que en principio tenían función protectora fallan, dando lugar a consecuencias perjudiciales para la salud (Vanitallie, 2002).

Durante distintos periodos de la vida de un individuo como son el periodo prenatal, el periodo perinatal, la infancia y la adolescencia se produce un incremento en la plasticidad de los sistemas de estrés y éstos son muy sensibles a estímulos estresantes (Seckl, 2001; Maccari y Morley-Fletcher, 2007). Durante periodos de estrés se activan

distintas áreas cerebrales localizadas en los circuitos límbicos como son la amígdala para la formación de la memoria emocional y la posterior respuesta emocional, el hipocampo para los procesos de memoria y aprendizaje y las regiones frontales de la corteza para la planificación y el control de las acciones. Todas estas estructuras cooperan para el control de las emociones, el aprendizaje cognitivo y la gestión de las respuestas neuroendocrinas (Berardelli y cols., 2013).

### **2. El eje Hipocampo-Hipotálamo-Hipófiso-Suprarrenal**

El hipocampo forma parte de la llamada formación hipocampal, en la cual también se integran el giro dentado, la circunvolución supracallosa, el fórnix y el área septal (deGroot y cols., 1989). La formación hipocampal se encuentra cerca de las estructuras olfatorias y está delimitada por el surco rinal y la fisura hipocampal, siendo esta localización similar en todos los mamíferos (Insausti, 1993). El hipocampo está involucrado en el aprendizaje y la memoria espacial siendo la neurogénesis en esta estructura necesaria para la formación de nuevas memorias (Gould y cols., 1999). El hipocampo envía señales neuronales al hipotálamo y al área septal principalmente a través del fórnix (Sapolsky y cols., 1989; Bittar y Bittar, 1997).

El hipotálamo se encuentra en la base del cerebro, alrededor del tercer ventrículo y constituye la mayor parte de la región ventral del diencefalo, ocupando aproximadamente un 2% del volumen total del cerebro. El hipotálamo está delimitado por el quiasma óptico en la región anterior y por los cuerpos mamilares y la comisura posterior en la región posterior (Daniel, 1976; Haines, 2003). El hipotálamo está implicado en distintas funciones como son modular el funcionamiento del sistema nervioso autónomo, ya que contiene neuronas con receptores capaces de responder a cambios de temperatura, osmolaridad y concentración de hormonas circulantes en sangre, regular la actividad de la adenohipófisis mediante la secreción de hormonas y, además, posee actividad endocrina, produciendo y secretando hormonas que pasan al torrente sanguíneo (Haines, 2003). El hipotálamo está compuesto por múltiples subdivisiones nucleares de cuerpos neuronales, cada uno de los cuales está implicado en diversas funciones, lo que nos indica que esta estructura ha de ser capaz de responder a señales de diferente tipo y origen (Haines, 2010).

Además, el hipotálamo se encarga del proceso de regulación de la ingesta a corto plazo, ya que, contiene múltiples sistemas neuronales que contribuyen a la regulación de la

homeostasis del balance energético; algunos estimulan el consumo de alimento (orexigénicos) y otros lo disminuyen (anorexigénicos) (Perello y Spinedi, 2004; González-Jiménez y Schmidt Río-Valle, 2012).

El núcleo arcuato del hipotálamo es uno de los más importantes para el control del balance energético. En este núcleo existen al menos dos poblaciones neuronales distintas productoras de sustancias que controlan el apetito como son neuropéptido Y (NPY), proopiomelanocortina (POMC), el transcrito regulado por cocaína y anfetamina (CART), el péptido relacionado con la proteína agouti (AgRP), GABA y glutamato y que además están reguladas por las hormonas periféricas implicadas en el control de la ingesta. En este núcleo es donde existe una barrera hematoencefálica más débil y por tanto donde hay una mayor comunicación directa con las distintas señales periféricas (Perello y Spinedi, 2004; Proulx y Seeley, 2005). Las neuronas del núcleo arcuato del hipotálamo secretan sustancias orexigénicas como NPY y AgRP y péptidos anorexigénicos como POMC y CART. Además del núcleo arcuato del hipotálamo, otras regiones están implicadas en el control de la ingesta como son el núcleo paraventricular (PVN) produciendo péptidos anorexigénicos como la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y oxitocina y el núcleo lateral del hipotálamo y el área perifornical que secretan sustancias orexigénicas como la hormona concentradora de melanina (MCH) (Valassi y cols., 2008).

La hipófisis es una pequeña glándula situada debajo del cerebro, en la silla turca del esfenoides y se conecta con el hipotálamo a través del tallo hipofisario. La zona de unión entre ambas estructuras es la eminencia media. En la hipófisis se diferencian la adenohipófisis, la pars intermedia y la neurohipófisis.

En la adenohipófisis, hay dos clases de células, las células granulares que son las que producen las distintas hormonas y las células agranulares. Entre las hormonas producidas por la adenohipófisis se encuentran la hormona de crecimiento (GH), la prolactina (PRL), la hormona adrenocorticotropa o adrenocorticotropina (ACTH), la hormona foliculoestimulante (FSH), la hormona luteinizante (LH) y la hormona tiroestimulante (TSH), entre otras. Además, la hipófisis también es capaz de sintetizar un gran número de factores de crecimiento como pueden ser el factor de crecimiento similar a insulina (IGF-I) o el factor de crecimiento epidermal (EGF) entre otros (Diéguez y Aguilar, 1997; Martínez-Fraga, 2012). En la neurohipófisis se almacenan y secretan algunas de las hormonas producidas por el hipotálamo como son la oxitocina y la hormona antidiurética.

### **2.1. Activación del eje Hipocampo-Hipotálamo-Hipófiso-Suprarrenal y su relación con el estrés**

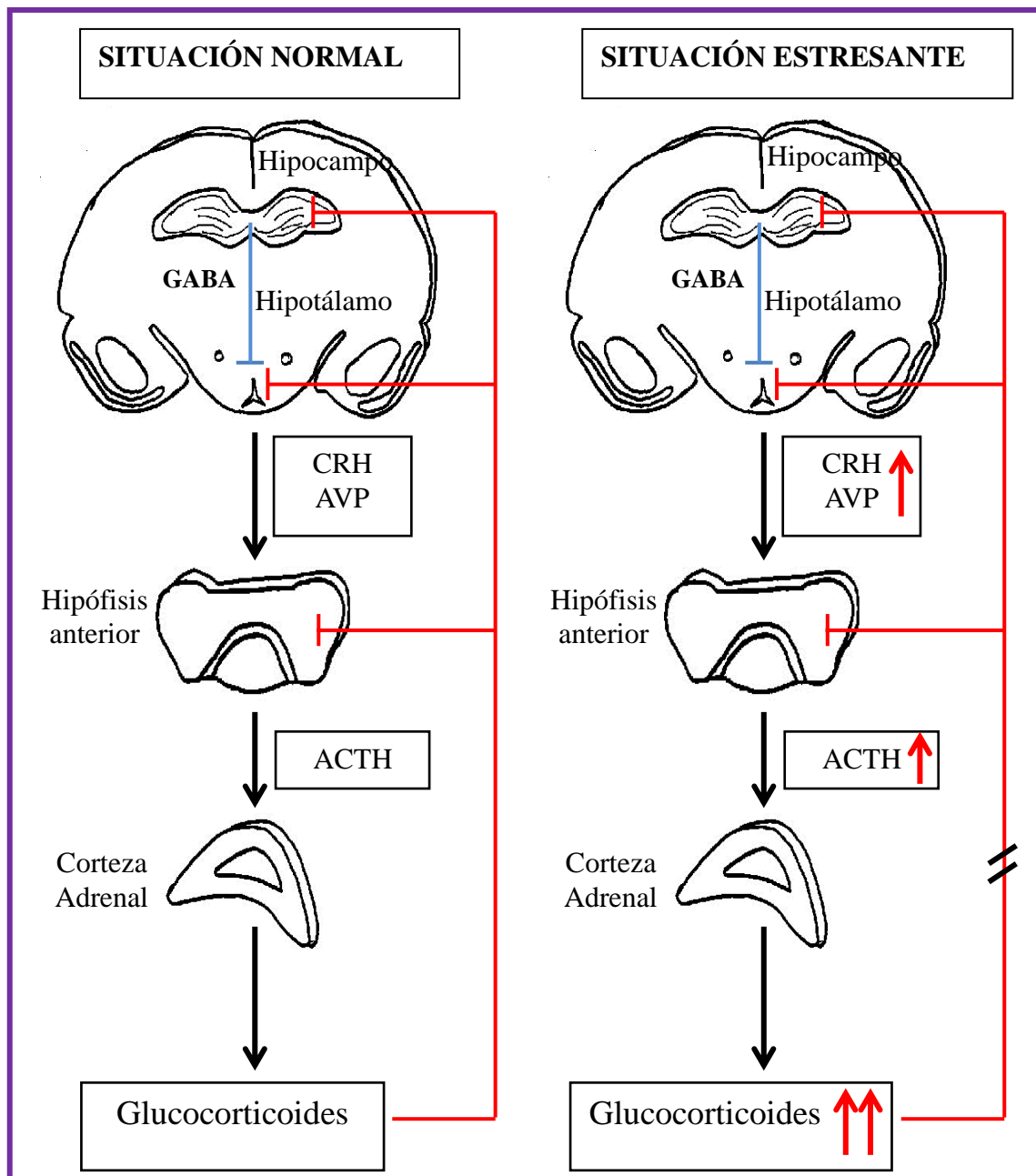
En la adaptación de un organismo a los cambios ambientales participan distintos mecanismos de respuesta a estrés activándose circuitos centrales y periféricos como son el eje hipotálamo-hipófiso-suprarrenal, el sistema simpático y el sistema límbico (Vanitallie, 2002; Maccari y Morley-Fletcher, 2007), siendo el eje hipocampo-hipotálamo-hipófiso suprarrenal (HHHS) el principal sistema neuroendocrino asociado con respuesta a estrés (Bose y cols., 2009). El eje HHHS está controlado por un complejo mecanismo regulador en el cual están principalmente implicadas las neuronas del núcleo paraventricular del hipotálamo, la CRH y la arginina-vasopresina (AVP), que a su vez están reguladas por otros neurotransmisores y neuropéptidos (Gaillard y Al-Damluji, 1987; Maccari y Morley-Fletcher., 2007; Berardelli y cols., 2013). En condiciones normales, la activación del eje se inicia con la síntesis y secreción al torrente sanguíneo de CRH y AVP que actuarán sobre la hipófisis anterior estimulando la producción y secreción de ACTH, induciendo la síntesis y liberación de glucocorticoides en la corteza adrenal. Los glucocorticoides a su vez actúan sobre el hipotálamo y la hipófisis inhibiendo la liberación de CRH y AVP mediante un mecanismo de retroalimentación negativo. La inhibición de la liberación de glucocorticoides es llevada a cabo por el hipocampo a través de proyecciones inhibitorias mediadas por neuronas GABAérgicas hacia el núcleo paraventricular del hipotálamo. Este mecanismo es el más importante en la modulación de la actividad del eje, en el mantenimiento de la homeostasis, así como de su respuesta al estrés, evitando una reacción excesiva (Gaillard y Al-Damluji, 1987; Weinstock, 1997; Bertram y Hanson, 2002; Vanitallie, 2002; Berardelli y cols., 2013; Spencer, 2013). Además de este mecanismo de activación, se ha visto que las citoquinas producidas por las células inmunes o por los adipocitos también pueden estimular el eje, actuando sobre el hipotálamo, la hipófisis anterior y la corteza adrenal (Kyrou y cols., 2006; Bose y cols., 2009).

Los glucocorticoides poseen importantes acciones metabólicas periféricas principalmente sobre el metabolismo glucídico, aunque también desempeñan una función relevante en el control del metabolismo lipídico, proteico y oxidativo, el sistema neuroendocrino, el sistema cardiovascular, el balance de electrolitos, el sistema inmunitario y el proceso de inflamación, la fisiología reproductiva y el crecimiento (Grasa, 2004). Además, los glucocorticoides juegan un papel vital preparando al feto a término

para la vida extrauterina. Para ello, actúan como factores de transcripción de múltiples genes con diversos efectos durante el desarrollo. Por lo tanto, cualquier perturbación, aguda o crónica, del eje HHHS puede tener importantes efectos en el desarrollo de muchos tejidos en los sistemas cardiovascular, pulmonar, renal y nervioso central (Bertram y Hanson, 2002).

La acción de los glucocorticoides está mediada por los receptores de glucocorticoides (GR) o receptores tipo II y por los receptores de mineralocorticoides (MR) o receptores tipo I (Weinstock, 1997; Bertram y Hanson, 2002; Grasa, 2004; Proulx y Seeley, 2005). Los receptores de glucocorticoides están distribuidos en distintas regiones del sistema nervioso central, encontrándose mayoritariamente en las neuronas hipotalámicas y en las células corticotropas de la hipófisis, siendo los encargados de mediar los efectos de los corticosteroides destinados a la restauración de la homeostasis. Los receptores de mineralocorticoides, sin embargo, no se encuentran tan ampliamente distribuidos, localizándose principalmente en estructuras límbicas, siendo el hipocampo el lugar de máxima localización, aunque también se puede encontrar expresión de estos receptores en el hipotálamo (Maccari y Morley-Fletcher, 2007; Berardelli y col., 2013).

El estrés prenatal modifica las respuestas plásticas del cerebro adulto, incluyendo el eje hipocampo-hipotálamo-hipófiso-suprarrenal, que participa en el control neuroendocrino de la alimentación y el metabolismo en la vida adulta (McEwen, 1999; Lesage y cols., 2004). En situaciones de estrés crónico, ineludible o incontrolable se produce una hiperactividad del eje y del sistema nervioso simpático, liberándose al torrente sanguíneo mayor cantidad de CRH y ACTH, dando lugar a una mayor concentración de glucocorticoides circulantes, produciéndose así una acción aumentada de éstos en diferentes tejidos (Fride y cols., 1986; Takahashi y Kalin, 1991; McCormick y cols., 1995; Weinstock, 1997; Koehl y cols., 1999; Bertram y Hanson, 2002; Vanitallie, 2002; Mairesse y cols., 2007). En estas condiciones el mecanismo de retroalimentación negativa es ineficaz y se produce una activación continua del eje (Weinstock, 1997) (Figura 1).



**Figura 1:** Esquema representativo del eje hipocampo-hipotálamo-hipófisis-suprarrenal en situación normal (izquierda) y en situación estresante (derecha). CRH: Hormona liberadora de corticotropina; AVP: Vasopresina; ACTH; Hormona adrenocorticotropa; GABA: proyecciones gabaérgicas.

Distintos estudios llevados a cabo en roedores con diferentes tipos de estrés gestacional aseguran la existencia de una regulación alterada del eje en la descendencia en edad adulta (Fride y cols., 1986; McCormick y cols., 1995; Barbazanges y cols., 1996; Weinstock, 1997). La naturaleza multimolecular de los factores responsables del control



del eje HHHS es una hipótesis atractiva debido a la gran variedad de estímulos de estrés, ya que todos ellos podrían tener papeles específicos en distintas situaciones de estrés. Todas estas moléculas forman un mecanismo altamente sensible que regula de manera fina las hormonas de estrés en respuesta a una gran variedad de estímulos endógenos y exógenos. Dependiendo del tipo de estrés se verán alterados unos o varios de estos parámetros y afectarán a la cantidad y la duración de la secreción de ACTH y esteroides (Gaillard y Al-Damluji, 1987).

El incremento de corticosterona inducido por estrés en una hembra gestante dará lugar a cambios hormonales en el feto que permanecerán en el adulto y podrían conducir a situaciones patológicas de tipo neurológico y afectivo y patologías relacionadas con la función reproductora e inmune, con el crecimiento y el desarrollo, y con efectos adversos en el metabolismo, tanto en humanos como en roedores (Koehl y cols., 1999; Seckl, 2001; Maccari y cols., 2003; Lesage y cols., 2004; Maccari y Morley-Fletcher, 2007; Mairesse y cols., 2007; Vegiopoulos y Herzig, 2007; García-Cáceres y cols., 2010a), así como sobre la respuesta a un cambio metabólico durante la edad adulta (Torres y Nowson, 2007; García-Cáceres y cols., 2010a; Fuente-Martín y cols., 2012a). A nivel periférico, los glucocorticoides liberados de la glándula adrenal durante periodos de estrés provocan el catabolismo de proteínas, de lípidos y de carbohidratos dando lugar a un incremento en la glucemia y a la movilización de los depósitos de energía (Dallman y cols., 1995; Amsterdam y cols., 2002; Schmidt y cols., 2004). El estrés materno, tanto en humanos como en roedores, se asocia con un incremento en la probabilidad de tener alterados el metabolismo de la glucosa y la sensibilidad a insulina con un incremento de los niveles circulantes de leptina y dando lugar a sobrepeso en el adulto (Mueller y Bale, 2006; Maccari y cols., 2007; Lesage y cols., 2004).

Numerosos modelos animales de estrés prenatal o estrés temprano se emplean para el estudio de alteraciones de la función neuronal y el desarrollo de desórdenes del comportamiento a largo plazo. Algunos ejemplos de estos modelos son la inmovilización, la restricción de movimiento, la suspensión y los shocks repetidos (Ward y Weisz, 1980; Weinstock, 1997; Maccari y Morley-Fletcher, 2007). El estrés por restricción de movimiento es un modelo experimental común de estrés temprano conocido por sus consecuencias en el comportamiento y neurobiológicas, que simula a su vez un modelo de depresión (Weinstock, 2001; Maccari y cols., 2003; Maccari y Morley-Fletcher, 2007;

Darnaudéry y Maccari, 2008). Dependiendo de la magnitud del estrés, de su duración y/o intensidad se producirán distintos efectos en el SNC, con alteraciones en los sistemas neuroquímicos (activación de la neurotransmisión de serotonina y norepinefrina entre otros) (Blanchard y cols., 2001; Weinstock, 2001), cambios de la plasticidad sináptica con atrofia de las dendritas del hipocampo (McEwen, 1999) y reducción en el número de sinapsis hipocampales (Hayashi y cols., 1998; Kim y cols., 2006), asimetría cerebral (Huang y cols., 2013) y anomalías en la morfología del cerebro (García-Cáceres y cols., 2010b; Weinstock, 2001), inhibición de la muerte celular y neurogénesis (McEwen, 2000; Kim y cols., 2006; Lucassen y cols., 2006; Mairesse y cols., 2007; García-Cáceres y cols., 2010b). Estos cambios podrían condicionar la respuesta del cerebro frente a futuras situaciones fisiológicas o fisiopatológicas.

### **3. El eje Hipocampo-Hipotálamo-Hipofiso-Suprarrenal y la regulación del balance energético**

El sobrepeso y la obesidad se definen como una acumulación anormal y excesiva de tejido adiposo que conduce a un incremento en el riesgo de presentar patologías asociadas, así como de la mortalidad y que se manifiesta por un exceso de peso y volumen corporales (Martos-Moreno y Argente, 2011; Grupo de trabajo de la Guía de Práctica Clínica sobre la Prevención y el Tratamiento de la Obesidad Infantojuvenil, 2009). Esta acumulación excesiva de tejido adiposo es debida a una alteración crónica del balance energético, siendo la ingesta mayor que el gasto energético (Torres y Nowson, 2007; Nieuwenhuizen y Rutters, 2008).

El síndrome metabólico se define como una combinación de al menos tres de los siguientes factores, obesidad, elevada presión arterial, elevados niveles de triglicéridos en suero, bajos niveles de HDL, tolerancia a la glucosa alterada y resistencia a la insulina (Bose y cols., 2009; Grupo de trabajo de la Guía de Práctica Clínica sobre la Prevención y el Tratamiento de la Obesidad Infantojuvenil, 2009; Luo y cols., 2010).

La sobrenutrición, el tipo de dieta y una exposición crónica a un ambiente estresante pueden potencialmente conducir a un balance energético positivo y al desarrollo de la obesidad y de otras enfermedades metabólicas. Este fenómeno podría estar mediado, al menos en parte, por la activación o alteración del eje HHHS (Nieuwenhuizen y Rutters, 2008; Bose y cols., 2009), aunque esta relación es compleja debido a que otros muchos

factores contribuyen a tal efecto, como es la carga genética, el metabolismo del cortisol específico en cada tejido, la inflamación crónica, las hormonas leptina y grelina, entre otras, y las hormonas sexuales (Torres y Nowson, 2007; Bose y cols., 2009). Se requieren niveles fisiológicos de glucocorticoides para un apropiado control metabólico y una acción excesiva de los glucocorticoides se relaciona con una gran variedad de enfermedades metabólicas como son la diabetes tipo 2 y la obesidad (Vegiopoulos y Herzig, 2007).

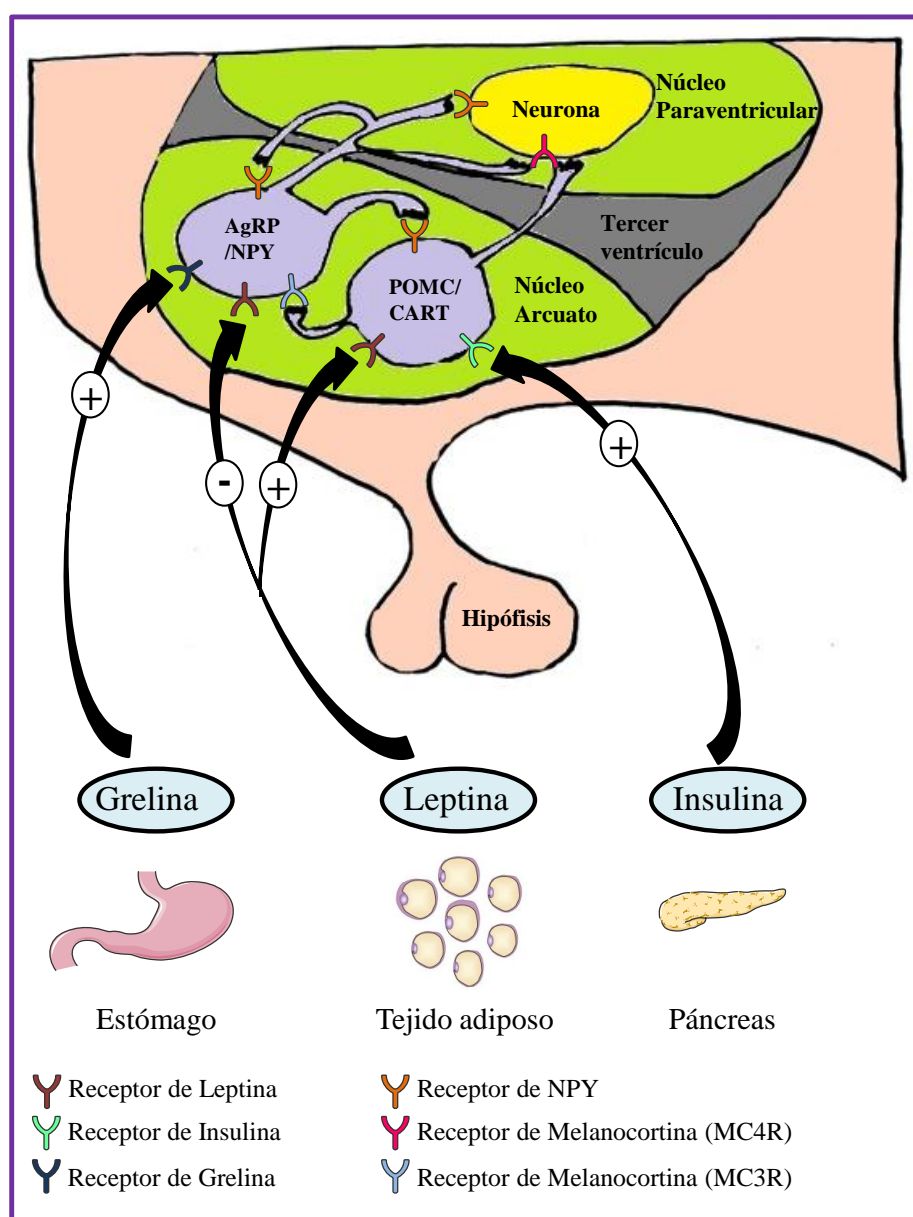
El ambiente prenatal y neonatal pueden influir a largo plazo sobre el crecimiento y el desarrollo, así como sobre la respuesta a un cambio metabólico durante la edad adulta (Torres y Nowson, 2007; García-Cáceres y cols., 2010a; Fuente-Martín y cols., 2012b), por ello, la exposición prenatal crónica a altos niveles de glucocorticoides durante la vida temprana del individuo (gestación o lactancia) inducirá efectos adversos en el metabolismo en la vida adulta en humanos y roedores y además, puede tener como resultado el desarrollo de obesidad y/o síndrome metabólico (Seckl, 2001; Lesage y cols., 2004; Mueller y Bale, 2006; Maccari y Morley-Fletcher, 2007; Bose y cols., 2009). Una hipótesis emergente en los últimos años es la de la “programación fetal”, la cual asegura que el crecimiento y desarrollo dentro del útero materno influenciarían el índice de masa corporal y la cantidad de tejido adiposo en el adulto (Mairesse y cols., 2007; Bose y cols., 2009).

La regulación de la ingesta energética constituye un proceso esencial para el adecuado funcionamiento celular ya que posibilita un equilibrio necesario entre la cantidad de energía almacenada en forma de grasa corporal y el catabolismo de la misma (González-Jiménez y Schmidt Río-Valle, 2012). Este equilibrio es regulado por un complejo sistema de señales tanto centrales como periféricas que interactúan para modular la respuesta individual a la ingesta de nutrientes. La regulación periférica incluye las señales de saciedad y las señales inducidas por los adipocitos, mientras que en el control central están involucrados distintos efectores, incluyendo los sistemas neuropeptidérgicos, monoaminérgicos y endocanabinoideos (Valassi y cols., 2008) y el eje hipotálamo-hipófiso-adrenal (Nieuwenhuizen y Rutters, 2008; Bose y cols., 2009; González-Jiménez y Schmidt Río-Valle, 2012). La alteración del equilibrio de este complejo entramado de señales puede originar el desarrollo de procesos patológicos crónicos como la obesidad (González-Jiménez y Schmidt Río-Valle, 2012). Diversos trabajos realizados tanto en humanos como en roedores relacionan el efecto del estrés sobre la ingesta y la ganancia de peso (Adam y Epel, 2007, García-Cáceres y cols., 2010a). Las neuronas que contienen

CRH, se encuentran predominantemente en el núcleo paraventricular del hipotálamo, siendo éste área el principal regulador del control del comportamiento alimentario. La administración central de CRH inhibe la ingesta en ratas y además es sugerido como un importante intermediario del efecto anorexigénico de la leptina y participa en el control inhibitorio de las vías neurales orexigénicas como la regulada por el NPY (Nieuwenhuizen y Rutters, 2008). Este mismo efecto de inhibición del apetito se ha observado en situaciones de estrés debido probablemente al incremento de los niveles hipotalámicos de CRH, ya que es un potente anorexigénico que activa el eje HHHS (Grasa, 2004; Spencer, 2013). Los glucocorticoides también poseen importantes efectos periféricos y centrales que regulan el balance energético, teniendo un efecto opuesto al de CRH en el SNC, estimularían la ingesta y potenciarían las acciones orexigénicas de NPY en el núcleo arcuato del hipotálamo. (Strack y cols., 1995; Dallman y cols., 1995; Perello y Spinedi, 2004; Kuo y cols., 2007; Nieuwenhuizen y Rutters, 2008; Uchoa y cols., 2012; Spencer, 2013). Además, la liberación de NPY del hipotálamo estimularía la angiogénesis en el tejido adiposo, la proliferación y la diferenciación de nuevos adipocitos, indicando así una relación directa entre la activación del eje HHHS, el NPY y el incremento de los depósitos de grasa abdominal (Nieuwenhuizen y Rutters, 2008).

Además, en el sistema de regulación del balance energético participan numerosos péptidos periféricos con acciones sinérgicas o antagónicas sintetizadas en distintos tejidos, como la insulina, la grelina y la leptina entre otros. Estos péptidos interactúan entre sí y con diferentes señales neurales conduciendo la información hacia distintos núcleos quienes a su vez emitirán una respuesta induciendo o inhibiendo el metabolismo y, por ende, el aumento o disminución del gasto calórico (González-Jiménez y Schmidt Río-Valle, 2012). Tanto la leptina como la insulina poseen receptores específicos en el SNC, localizándose elevadas concentraciones en las neuronas del núcleo arcuato del hipotálamo (Proulx y Seeley, 2005). El papel de la leptina y la insulina en el núcleo arcuato del hipotálamo incluiría dos mecanismos, la activación de neuronas POMC/CART y la inactivación o inhibición de las neuronas NPY/AgRP, teniendo así un efecto anorexigénico sobre la ingesta. Además, existe otro mecanismo que coordina la actividad de las neuronas AgRP/NPY con la de las neuronas POMC. Las neuronas AgRP/NPY tienen colaterales con sinapsis en las neuronas POMC. Estos terminales contienen GABA, de tal manera que cuando se activan las neuronas AgRP/NPY se libera GABA a las neuronas POMC,

inhibiéndolas (Perello y Spinedi, 2004; Proulx y Seeley, 2005). Con acciones inversas a la leptina y la insulina existe otro neuropéptido periférico que es la grelina, péptido perteneciente a la familia de los secretagogos de la hormona de crecimiento. La importancia de esta molécula en la regulación de la ingesta tiene lugar por varios mecanismos, siendo su principal vía de actuación a través del núcleo arcuato del hipotálamo donde inducirá la síntesis de varios péptidos orexigénicos como son NPY y AgRP (Proulx y Seeley, 2005; González-Jiménez y Schmidt Río-Valle, 2012). Por tanto, la grelina actuaría en oposición a las acciones de la leptina y la insulina en el núcleo arcuato del hipotálamo (Figura 2).



**Figura 2:** Esquema representativo de la regulación de la homeostasis energética y del apetito.

### **4. Dieta en sacarosa y metabolismo**

Las funciones endocrinas, incluyendo el metabolismo, también se pueden modificar en el animal adulto cuando se producen cambios nutricionales, alteraciones hormonales o una situación de estrés durante el desarrollo (Bowman y cols., 2004; Desai y cols., 2007; Erhuma y cols., 2007; Delahaye y cols., 2008). A menudo los hábitos alimenticios tienen un fuerte impacto en el desarrollo y la progresión de distintas enfermedades, así existen evidencias de que distintas enfermedades como la obesidad, la diabetes, la aterosclerosis, la hiperlipidemia, la resistencia a insulina y el deterioro cognitivo pueden ser influenciadas por cambios de dieta a largo plazo (Chepulis y Starkey, 2008). En la actualidad, se considera que la ingesta de una dieta con un alto contenido en grasa o en azúcares son las responsables, al menos en parte, del incremento de la obesidad y de sus complicaciones secundarias en los países desarrollados (Lindqvist y cols., 2008; Lomba y cols., 2009; Fuente-Martín y cols., 2012a; Mela y cols., 2012; Fuente-Martín y cols., 2012b).

Una gran variedad de estudios experimentales empleando dietas ricas en grasa y en azúcares se están llevando a cabo como modelos de obesidad inducida por la dieta. Sin embargo, no todos los tipos de dietas ejercen los mismos efectos sobre el metabolismo, dependiendo del tipo de dieta ingerido las acciones sobre la ganancia de peso, la composición corporal y las alteraciones metabólicas serán distintas (Gibson y cols., 1996; Ludwig y cols., 2001; Elliott y cols., 2002; Erhuma y cols., 2007; Melanson y cols., 2008). Así, la glucosa es capaz de estimular la producción de insulina o la de leptina por el tejido adiposo, mientras que la fructosa no, lo que genera diferentes respuestas metabólicas (Elliot y cols., 2002; Havel, 2005; Stanhope y Havel 2008). La sacarosa tiene efectos intermedios entre los de la fructosa y la glucosa en algunos parámetros metabólicos, pero no en otros (Stanhope y Havel, 2008). Además, se ha observado que el consumo de una dieta rica en sacarosa induce mayores alteraciones en los niveles circulantes de insulina y en la ganancia de peso corporal que una dieta que contenga la misma cantidad de glucosa o de fructosa (Ellwood y cols., 1980; Michaelis y cols., 1975).

Distintos experimentos han demostrado que la ingesta de sacarosa induce un incremento en la cantidad de kilocalorías ingeridas (Raben y cols., 2002; Lindqvist y cols., 2008; Fuente-Martín y cols., 2012b; Oliva y cols., 2011; Sheludiakova y cols., 2012). Como resultado de esta mayor ingesta calórica cabría esperar un incremento de la ganancia de peso corporal, sin embargo, aun se desconocen muchos aspectos del efecto de la ingesta

de azúcares sobre el peso corporal, ya que dependiendo del tipo de azúcar empleado, de la duración de la dieta, de la edad en la que el azúcar es introducido en la dieta e incluso del sexo de los animales, la dieta inducirá distintos efectos, incrementando (Ludwig y cols., 2001; Raben y cols., 2002; Deaciuc y cols., 2008; Chepulis y Starkey, 2008; Lindqvist y cols., 2008; Alzamendi y cols., 2010; Couvreur y cols., 2011; Oliva y cols., 2011), disminuyendo (Lewis y cols., 1992; Hill y Prentice, 1995; Gibson, 1996; Cambri y cols., 2010; Fuente-Martín y cols., 2012a) o no modificando (Sclafani y cols., 1987; Soria y cols., 2001; Yanovski, 2003; Michaels y Holzman, 2007; la Fleur y cols., 2010; Oliva y cols., 2011; Fuente-Martín y cols., 2012b; Sheludiakova y cols., 2012) el peso corporal.

Los cambios en la ingesta y en el peso corporal inducidos por la dieta darán lugar a alteraciones en los niveles circulantes de las hormonas implicadas en el metabolismo como pueden ser la leptina y la insulina. La ingesta de sacarosa incrementa los niveles de leptina en suero, sugiriendo un mecanismo de defensa frente al incremento de kilocalorías consumidas (Lindqvist y cols., 2005). Respecto a los niveles de insulina se ha observado que una dieta rica en sacarosa induce un rápido desarrollo de resistencia a insulina de manera similar a como lo hacen las dietas ricas en grasa (Pagliassotti y cols., 1996; Storlien y cols., 1988). Además, las variaciones en el peso derivadas de la ingesta de una dieta rica en carbohidratos pueden deberse a mecanismos de compensación en la ingesta modulando los distintos neuropéptidos implicados en el control de ésta. Así, distintos estudios muestran que una dieta rica en grasa o en sacarosa induce un descenso de los niveles de ARNm de NPY y AgRP y un incremento de POMC (Kim y cols., 1998; Ziotopoulou y cols., 2000; Hansen y cols., 2001; Dziedzic y cols., 2007).

Por otro lado, una dieta rica en sacarosa induce dislipidemia e incrementa el riesgo de daño cardiovascular (Seiva y cols., 2010). El consumo de sacarosa durante dos semanas incrementó los niveles séricos de ácidos grasos libres, triglicéridos y colesterol (Huang y cols., 2004), indicando que la ingesta de soluciones azucaradas incrementa la lipogénesis y la síntesis de triglicéridos en el hígado (Chong y cols., 2007). Además, la ingesta de sacarosa incrementa la síntesis y secreción de VLDL en el hígado e induce hipertrigliceridemia tanto en humanos como en ratas (Kannan y cols., 1981; Strobl y cols., 1989; Saku y cols., 1996).

### **5. El recambio celular**

La muerte celular es la pérdida de estructura o energía en la célula y ocurre debido a la incapacidad de las células para revertir los daños sufridos por algún agente dañino. Se puede decir que una célula está muerta cuando ha perdido irreversiblemente su capacidad de mantener la composición específica de su medio intracelular y de adaptarse a su medio extracelular (Anaya-Velázquez y Padilla-Vaca, 2010). La muerte celular puede ser clasificada de acuerdo a distintos criterios como pueden ser la apariencia morfológica de la célula, las características enzimológicas, los aspectos funcionales o las características inmunológicas (Galluzzi y cols., 2007; Kroemer y cols., 2009). En la actualidad la clasificación más empleada de los distintos tipos de muerte celular sigue siendo la correspondiente a las características morfológicas ocurridas en cada uno de ellos, ya que en cada tipo de muerte se observan una serie de cambios que son difícilmente confundibles con el resto (Galluzzi y cols., 2007). En esta revisión doctrinal nos centraremos en el proceso de apoptosis y en su regulación.

La apoptosis o muerte celular programada es un proceso de muerte celular activo controlado genéticamente, por el que, se eliminan las células dañadas o que ya no son necesarias para el organismo mediante un proceso de autodestrucción celular. Este proceso forma parte del desarrollo normal de un organismo y se da como respuesta a una gran variedad de estímulos fisiológicos o patológicos a lo largo de la vida del individuo (Wang, 2000; Fan y col., 2005; MacKenzie y Clark, 2012; Muñoz-Pinedo, 2012). Durante el proceso de apoptosis la célula sufre una serie de cambios como son reducción del volumen celular, condensación de la cromatina y fragmentación nuclear, formación de ampollas en la membrana, activación de las caspasas y la formación de vesículas membranosas denominadas cuerpos apoptóticos que contienen a los orgánulos citoplasmáticos intactos o fragmentos del núcleo (Wang, 2000; Wang y cols., 2005; Galluzzi y cols., 2007; Ghavami y cols., 2009; Kroemer y cols., 2009; Ola y cols., 2011).

La alteración del proceso apoptótico puede dar lugar a muchas enfermedades y procesos patológicos como pueden ser cáncer, autoinmunidad y neurodegeneración (Wang y cols., 2005; Ola y cols., 2011). Para la cura de éstas enfermedades, las caspasas son dianas potenciales debido a su importante papel en apoptosis. Algunos autores han demostrado que los inhibidores de las caspasas son eficaces en modelos animales de accidente cerebrovascular, lesiones por isquemia-reperfusión, enfermedades del hígado y



por lesiones cerebrales traumáticas (Wang y cols., 2005).

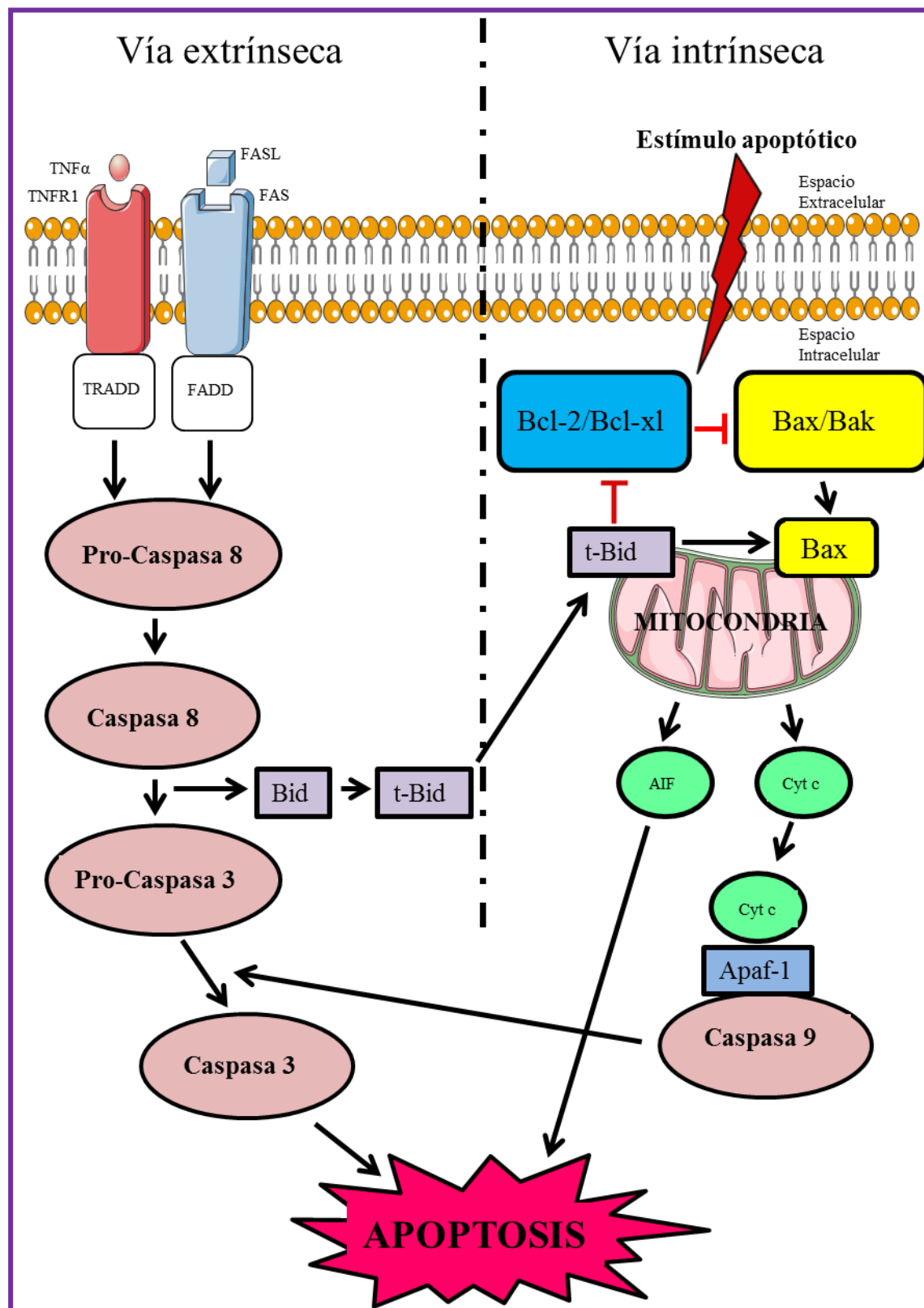
Las principales rutas de apoptosis son las dependientes de caspasas. Las más conocidas son la ruta intrínseca, mediada por estrés o por la mitocondria y la ruta extrínseca, mediada por los receptor de muerte (Fan y cols., 2005; Wang y cols., 2005; Ola y cols., 2011), aunque existen dos rutas más, la ruta mediada por la granzima B y la ruta mediada por el retículo endoplasmático (Wang y cols., 2005; Ghavami y cols., 2009).

En la **vía extrínseca** distintas señales de muerte como pueden ser Fas ligando o el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) son reconocidas por sus correspondientes receptores de muerte, situados en la membrana plasmática de la célula. La unión de ambos dará lugar a la activación de los receptores y a la posterior unión de otras proteínas como son el dominio de muerte asociado a Fas (FADD) o el dominio de muerte asociado a TNFR (TRADD). Dicha unión dará lugar a la oligomerización y/o a cambios conformacionales en el receptor permitiendo la agregación de FADD o TRADD y la aparición de los dominios efectores de muerte (DED). La exposición de estos dominios permite la unión entre éstos y los dominios DED del prodominio de la procaspasa-8, la cual inducirá la oligomerización de la procaspasa-8 localizada en la parte citosólica de la membrana plasmática. Todas estas proteínas forman el complejo inductor de muerte (DISC). A este complejo se unirán dos subunidades de procaspasa-8, dando lugar a la autoactivación de ésta y formándose la caspasa-8. La activación de la cascada de señalización activada por la caspasa-8 será diferente según el tipo celular en el que el proceso tenga lugar. Así, en unos tipos celulares la caspasa-8 está totalmente activada y puede activar directamente a las caspasas efectoras como la caspasa-3 y, sin embargo, en otros tipos celulares la caspasa-8 no está totalmente activada y no es capaz de activar las caspasas efectoras directamente sino que puede activar a la vía intrínseca de apoptosis mediante el procesamiento de la proteína Bid a tBid. De una forma u otra el resultado final será la muerte celular por apoptosis (Haupt y cols., 2003; Fan y col., 2005; Wang y cols., 2005; Ghavami y cols., 2009; Ola y cols., 2011) (Figura 3).

La **vía intrínseca** es activada por agentes extra e intracelulares como pueden ser estrés oxidativo o metabólico, radiación UV, retirada de factores de crecimiento, daño del ADN o tratamientos con drogas citotóxicas. En este proceso la mitocondria sufre dos cambios importantes: por una parte, la membrana externa de la mitocondria se hace permeable a ciertas proteínas dando lugar a la liberación de factores como el citocromo c

que de forma natural se encontrarían entre la membrana interna y externa de la mitocondria y se reduce el potencial de membrana de la membrana interna; por otra parte, la liberación del citocromo c al citosol induce la formación de un complejo heptamérico denominado apoptosoma, compuesto por citocromo c, Apaf-1 (factor activador de proteasas apoptóticas), deoxiadenosina trifosfato (dATP) y la pro-caspasa-9. La formación de este complejo permite el procesamiento y la autoactivación de la caspasa-9 y la posterior activación de las caspasas efectoras -3, -6 y -7, iniciando la cascada proteolítica (Haupt y cols., 2003; Wang y cols., 2005; Cheng y cols., 2008; Ghavami y cols., 2009) (Figura 3).

Ambas vías convergen en la caspasa-3 y a través de la proteína pro-apoptótica Bid. Bid es un miembro de la familia Bcl-2 que se encuentra en el citosol y es procesado por la caspasa-8 a tBid, el cual, translocará a la mitocondria. En la mitocondria, tBid activa a Bax (proteína X asociada a Bcl-2) iniciando así la liberación de citocromo c, la disfunción de la mitocondria y la activación de las caspasas-9 y -3, induciendo finalmente apoptosis (Wang y cols., 2005; Ghavami y cols., 2009).



**Figura 3:** Esquema de las vías extrínseca e intrínseca de apoptosis.

En mamíferos se conocen 14 caspasas diferentes, de las cuales no todas ellas tienen un papel en muerte celular y las que sí lo tienen, además pueden tener otras funciones como son supervivencia celular, proliferación, diferenciación e inflamación. Las caspasas son sintetizadas como zimógenos inactivos (pro-enzimas) que son cortados en el sitio proteolítico interno para formar el enzima activo. Las caspasas se dividen en dos grupos según su función y el momento del proceso en que se están involucradas, caspasas iniciadoras y caspasas efectoras (Wang, 2000; Fan y cols., 2005; Ghavami y cols., 2009, Ola y cols., 2011; MacKenzie y Clark, 2012). Las caspasas iniciadoras, caspasas-8 y -9, procesan las formas inactivas de las caspasas efectoras como las caspasas-3 y -7, activándolas, aunque también pueden actuar amplificando la cascada de caspasas, incrementando la activación de las caspasas iniciadoras. Las caspasas efectoras una vez activadas procesan a su vez otros sustratos proteicos como son proteínas reguladoras y estructurales del núcleo, del citoplasma y del citoesqueleto que mediarán llevando finalmente a las alteraciones morfológicas y bioquímicas características de la apoptosis (Wang y cols., 2005; Ghavami y cols., 2009). Además, las caspasas efectoras pueden ser activadas por otras proteasas como son catepsinas, calpaínas y granzimas (Ghavami y col., 2009). Las principales funciones de las caspasas son detener el ciclo celular e inactivar la reparación del ADN, inactivar a la proteína inhibidora de la apoptosis ligada al cromosoma X (XIAP) y desestructurar el citoesqueleto celular (Wang y cols., 2005). Las calpaínas son proteínas pertenecientes a una familia de 14 miembros de cistein proteasas dependientes de calcio (Huang y Wang, 2001; Arroba y cols., 2009; Vosler y cols., 2008). Las primeras calpaínas descritas en mamíferos (1964) y que están distribuídas de forma ubícua son la calpaína 1 (calpaína  $\mu$ ) y la calpaína 2 (calpaína  $m$ ) que se activan por concentraciones micromolares y milimolares de calcio, respectivamente. Estas proteasas son heterodímeros compuestos de una subunidad catalítica de 80 kDa y una subunidad reguladora de 28 kDa que están asociadas con el inhibidor endógeno de la calpaína, la calpastatina (Ray y cols., 2000; Huang y Wang, 2001; Suzuki y cols., 2004; Arroba y cols., 2009).

Un incremento de  $Ca^{2+}$  intracelular produce la autólisis y activación de las calpaínas activando a su vez a otras proteínas involucradas en apoptosis como Bax, p53, pro-caspasa-9 y -3 y la polimerasa poli-ADP-ribosa (Wood y cols., 1998; McGinnis y cols., 2003; Lee y cols., 2000; Piechaczyk, 2000; Kar y cols., 2010) y además proteínas del citoesqueleto (Vanags y cols., 1996), dando lugar a la desestructuración del mismo y a

daños estructurales en la membrana, produciéndose finalmente la muerte celular por apoptosis (Squìer y cols., 1994; Kar y cols., 2010). Además de estar implicadas en muerte celular mediante la activación de las caspasas, se ha descrito el papel de las calpaínas en procesos de muerte a través de las vías de apoptosis independientes de caspasas, vía AIF (Kar y cols., 2010).

Las calpaínas además de tener un papel importante en muerte celular están implicadas en un amplio rango de funciones fisiológicas entre las que se encuentran la motilidad celular, diferenciación, transducción de señales incluyendo vías de supervivencia celular, progresión del ciclo celular, regulación de la expresión de genes y potenciación a largo plazo (Goll y cols., 2003; Suzuki y cols., 2004; Franco y Huttenlocher, 2005). Las alteraciones en los genes de las distintas calpaínas o en su actividad están relacionadas con multitud de enfermedades como pueden ser daños neurológicos agudos, Alzheimer, cataratas, diabetes tipo 2 y cáncer de estómago (Huang y Wang, 2001; Suzuki y cols., 2004).

La actividad de ambas calpaínas está regulada por la calpastatina cuyos niveles y eficiencia podrían desempeñar una función crítica en la prevención de la proteólisis mediada por calpaínas (Ray y cols., 2000). El complejo, calpaínas-calpastatina se encuentra predominantemente en el retículo endoplasmático (Arroba y cols., 2009), aunque otros estudios sitúan este complejo también en la mitocondria (Kar y cols., 2010). La calpastatina presenta en su receptor un elemento de respuesta a AMPc (CREB), sugiriendo una vía de actuación directa por la cual la activación de CREB incrementaría la transcripción del gen de la calpastatina y reduciría la proteólisis mediada por las calpaínas (Arroba y cols., 2009). En algunos estudios se ha visto que el incremento en la expresión de los niveles de calpastatina está asociado con reducido daño de la médula espinal y apoptosis neuronal (Wingrave y cols., 2004; Higuchi y cols., 2005; Kar y cols., 2010). Además, algunos autores han observado que los inhibidores de las calpaínas como MDL28170, PD150606 y SJA6017 tienen propiedades neuroprotectoras tanto en modelos *in vivo* como en cultivos celulares (Ray y cols., 2000; Wang, 2000; Huang y Wang, 2001).

El proceso de muerte celular se encuentra regulado por múltiples proteínas y factores de transcripción como son los miembros de la familia Bcl-2, el citocromo c y la proteína factor 1 activadora de la proteasa apoptótica (Apaf-1) (Reed, 1994; Schuler y Green, 2001; Fan y cols., 2005; Wang y cols., 2005; Xu y cols., 2009; Ola y cols., 2011).

Las proteínas de la familia de Bcl-2 son factores reguladores de la apoptosis que se dividen en dos grupos según su estructura y función. Las proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 o Bcl-xL son proteínas mitocondriales con cuatro dominios homólogos (BH), cuya función es bloquear la muerte celular uniéndose a las proteínas pro-apoptóticas Bax y Bak e inhibiéndolas, previniendo así la liberación de citocromo c. Las proteínas pro-apoptóticas se dividen en dos subgrupos dependiendo del número de dominios BH que posean, entre ellos destacan la proteína Bax o Bak y las proteínas Bad, Bid o Bim con sólo el dominio BH3. Estas proteínas se encuentran en el citoplasma y en respuesta a un estímulo apoptótico se traslocan a la membrana mitocondrial externa, permitiendo la liberación desde la mitocondria de otros factores pro-apoptóticos como el citocromo c y el factor inductor de apoptosis (AIF), desencadenando el proceso apoptótico. Las proteínas Bid y Bim contribuyen a la función pro-apoptótica de Bax y Bak induciendo oligomerización de éstas (Amsterdam y cols., 2002; Fu y Fan, 2002; Fan y cols., 2005; Ghavami y cols., 2009; Ola y cols., 2011). El ratio entre proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2) y pro-apoptóticas (Bax) parece determinar la sensibilidad o resistencia de la célula frente a los estímulos apoptóticos (Amsterdam y cols., 2002; Ola y cols., 2011).

El estrés celular conlleva la estabilización y activación de algunos factores de transcripción como la proteína supresora de tumores p53; esta proteína p53 es un factor de transcripción que activa procedimientos vitales frente a daños para restringir el crecimiento celular aberrante en respuesta al daño del ADN, inducir activación de oncogenes, hipoxia y la pérdida de los contactos normales de la célula. Esto da lugar a restricción del crecimiento celular mediante inducción de senescencia, parada del ciclo celular y apoptosis, por ello, esta proteína es considerada el guardián del genoma (Butt y cols., 1999; Fridman y Lowe, 2003; Haupt y cols., 2003; Amaral y cols., 2010). Distintos factores son los responsables de la inducción de apoptosis mediada por p53, los niveles de expresión de p53, el tipo de la señal de estrés, el tipo celular y el contexto celular en el momento de la exposición a estrés (Schuler y Green, 2001; Haupt y cols., 2003). La muerte celular inducida por p53 tiene lugar mediante numerosos mecanismos, entre ellos, la activación de caspasas mediante la liberación de factores apoptogénicos de la mitocondria. Esta liberación es regulada por las proteínas de la familia Bcl-2, las cuales inducen o previenen la permeabilización de la membrana (Schuler y Green, 2001; Fridman y Lowe, 2003; Haupt y cols., 2003; Amaral y cols., 2011). Por otro lado, p53 media sus efectos

apoptóticos mediante la regulación del eje IGF (factor de crecimiento similar a insulina), tanto a nivel de la disponibilidad de ligandos de IGF (modulando su transcripción) como de la actividad y expresión de los receptores de IGF (Butt y cols., 1999) y regulando inhibidores de la vía fosfatidil inositol 3´Kinasa (PI3K) como PTEN (Fridman y Lowe, 2003)

Otro factor muy importante que podría estar implicado en la regulación del proceso de muerte celular es IGF-I. Éste, es un factor de crecimiento de expresión ubicua importante debido a la gran cantidad de funciones que desempeña a lo largo de la vida del individuo, entre las que se podrían destacar regulación del desarrollo fetal, diferenciación, proliferación y supervivencia en distintos tejidos y líneas celulares (Butt y cols., 1999; Frago y cols., 2002; Frago y cols., 2005; Zheng y Quirion, 2006; Arroba y cols., 2009). El sistema del factor de crecimiento similar a insulina está compuesto por una familia de ligandos, receptores y proteínas de unión que interactúan entre ellos. La mayor parte del IGF-I circulante es producido en el hígado y regulado por la hormona de crecimiento, aunque también se puede detectar la expresión del mensajero en pequeñas cantidades en la mayor parte de los tejidos, excepto en el hígado donde se encontrará en grandes cantidades por ser el principal sitio de producción (Butt y cols., 1999).

Tanto IGF-I como IGF-II puede actuar de forma endocrina y como factor de crecimiento local de manera paracrina y autocrina. La mayor parte de las acciones celulares de IGF son mediadas por la unión de los péptidos con el receptor de IGF-I (IGF-IR). La unión de IGF-I a su receptor inducirá la autofosforilación del receptor y la activación de las proteínas tiroxina quinasas intrínsecas, lo que dará lugar a la fosforilación de otros factores intracelulares como pueden ser IRS-1, Shc, Ras y Raf, dando lugar a la activación de múltiples vías de señalización entre las que se incluyen las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) y la vía PI3K/Akt (Butt y cols., 1999; Zheng y Quirion, 2006). Este proceso podría estar mediado a través de la fosforilación de elementos de respuesta a AMPc (CREB) y la regulación de la expresión en distintos tipos celulares de una gran variedad de genes que contienen un elemento de respuesta a AMPc como por ejemplo, calpastatina y Bcl-2. Se ha descrito que la fosforilación de CREB es una posible diana de Akt en la supervivencia mediada por IGF-I. Akt está principalmente implicada en desarrollo celular, crecimiento y supervivencia (Kulik y Weber, 1998; Butt y cols., 1999; Zheng y Quirion, 2006; Arroba y cols., 2009). Por ello, IGF-I podría ser capaz de

disminuir la activación de la calpaína a través de la vía Akt-CREB resultando en acciones antiapoptóticas. Además de actuar por estas vías, IGF-I podría promover supervivencia celular modulando directamente a los miembros pro y antiapoptóticos de la familia Bcl-2 o a las caspasas, ya que varios estudios han indicado que la señalización a través de IGF-IR podría suprimir la activación de las caspasas (Butt y cols., 1999).

El recambio celular es fundamental en la respuesta metabólica. Un aumento de los mediadores inflamatorios en el hipotálamo mediobasal contribuye al aumento de peso y la resistencia a la insulina en modelos de obesidad inducida por la dieta en roedores (De Souza y cols., 2005; Zhang y cols., 2008; Thaler y Schwartz, 2010). Esta respuesta inflamatoria es debida al daño neuronal, estando directamente afectadas las neuronas POMC del núcleo arcuato del hipotálamo (Moraes y cols., 2009; Horvath y cols., 2010, Thaler y cols., 2012). Dado que las células POMC juegan un papel esencial protegiendo contra la obesidad, la pérdida de éstas es suficiente para causar un exceso de peso corporal (Gropp y cols., 2005).

Los glucocorticoides tienen un fuerte impacto en la programación fetal (Weinstock, 2001) y el cerebro es muy sensible a esta programación prenatal. Los glucocorticoides ejercen un efecto relevante en una gran variedad de células en mamíferos, alterando tanto la expresión de genes como el metabolismo celular. Los glucocorticoides inducen apoptosis en muchos tipos de células nucleadas, desempeñando una función anti-inflamatoria (Amsterdam y cols., 2002; Schmidt y cols., 2004). Sin embargo, cada vez hay mayor número de evidencias otorgando a los glucocorticoides una acción complementaria, protegiendo a las células, tejidos y órganos donde la inflamación tiene lugar; es decir, ejerciendo una función relevante en supervivencia (Amsterdam y cols., 2002; Ayroldi y cols., 2012). Diversos estudios han demostrado que el estrés prenatal afecta al cerebro fetal dando lugar a alteraciones estructurales. Estudios previos del grupo han demostrado que el estrés prenatal por restricción de movimiento altera el recambio celular en el hipotálamo de ratas macho adultas (García-Cáceres y cols., 2010b). La composición celular de la hipófisis puede ser también modificada por eventos tempranos, siendo las distintas poblaciones celulares susceptibles al proceso de muerte celular en el adulto (Carbajo-Pérez y Watanabe, 1990; González-Parra y cols., 2000; Weinstock, 2008). Estos cambios en la capacidad proliferativa podría modificar la actividad fisiológica. Además, se ha descrito que distintos tipos de dietas como pueden ser una dieta rica en sacarosa, glucosa o fructosa



inducen cambios sobre la muerte celular y la proliferación (Van der Borght y cols., 2011), alterando así el recambio celular.



## **HIPÓTESIS**



## **HIPÓTESIS**

El estrés prenatal modifica la respuesta metabólica a una dieta rica en sacarosa introducida en la edad adulta, siendo esto debido, al menos parcialmente a cambios en el recambio celular en el eje hipocampo-hipotálamo-hipofisario y produciéndose dichos efectos tanto de manera aguda como a largo plazo.



## **OBJETIVOS**





## **OBJETIVOS**

**Objetivo 1.** Investigar el efecto del estrés prenatal subcrónico sobre la respuesta a una dieta rica en sacarosa introducida en la etapa adulta.

**Objetivo 2.** Analizar el posible dimorfismo sexual del efecto del estrés prenatal, así como de la respuesta metabólica a la introducción de una dieta rica en sacarosa en la etapa adulta.

**Objetivo 3.** Investigar el efecto del estrés prenatal subcrónico sobre el recambio celular en el eje hipocampo-hipotálamo-hipofisario de ratas macho adultas y los mecanismos intracelulares implicados.

**Objetivo 4.** Estudiar en el hipocampo y el hipotálamo de embriones de 17 días el efecto del estrés prenatal subcrónico y el posible dimorfismo sexual sobre el recambio celular y los mecanismos intracelulares implicados, así como sobre los neuropéptidos hipotalámicos.

**Objetivo 5.** Analizar el efecto del estrés prenatal subcrónico sobre el recambio celular y los mecanismos intracelulares implicados en el hipotálamo y el hipocampo de ratones macho y hembra adultos en respuesta a una dieta rica en sacarosa introducida en la etapa adulta.



## **MATERIALES Y MÉTODOS**



## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **1. REACTIVOS**

Los reactivos necesarios para el análisis por Western blot, exceptuando los indicados, se adquirieron en Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA, Estados Unidos).

El resto de reactivos o productos químicos fueron comprados en Merck (Barcelona, España) o en Sigma-Aldrich, Inc. (Saint Louis, MO, Estados Unidos), salvo los que se indican en su correspondiente apartado.

### **2. ANIMALES Y MODELOS DE EXPERIMENTACIÓN *IN VIVO***

#### **2.1. Animales de experimentación**

Para llevar a cabo este trabajo se emplearon Ratas Wistar jóvenes adultas (10-14 semanas) procedentes de los laboratorios Harlan (Indianapolis, IN, Estados Unidos) y ratones de la cepa C57BL/6 obtenidos de la cría en el animalario de la Universidad Complutense de Madrid, lugar donde se llevaron a cabo todos los modelos experimentales aquí reflejados. Los animales se mantuvieron en condiciones estándar: ciclos de 12 horas de luz y 12 de oscuridad, manteniéndose el estabulario con ventilación continua, a temperatura ambiente (22-24°C) y con una humedad relativa entre 50-55%. Los animales fueron alimentados con pienso granulado (dieta completa de mantenimiento para roedores A04 para animales adultos y A03 para crías, Panlab, Barcelona, España); como bebida se les suministró agua corriente o una solución de sacarosa al 33% *ad libitum*, según se especifique en cada modelo experimental. La dieta A04 contenía 2,9 Kcal/g de energía (16% de proteínas, 60% de carbohidratos y 3% de grasa) y la dieta A03 contenía 3 Kcal/g (21% proteínas, 52% carbohidratos y 5% grasa). En el momento del sacrificio se recogió la sangre del tronco de cada uno de los animales para la determinación de distintos parámetros séricos. A continuación, se dejó reposar 1 hora a temperatura ambiente (t.a.) y se centrifugó a 4000 x g durante 10 minutos a 4°C para separar el suero, que se conservó a -80°C hasta su utilización.

Todos los experimentos fueron aprobados por el comité ético de la Universidad Autónoma de Madrid y cumplieron con el real decreto 1201/2005 (Boletín Oficial del Estado, BOE número 252) perteneciente a la protección de animales de experimentación y con la directiva del consejo de las comunidades europeas (86/609/EEC).

### **2.2. Modelos de experimentación**

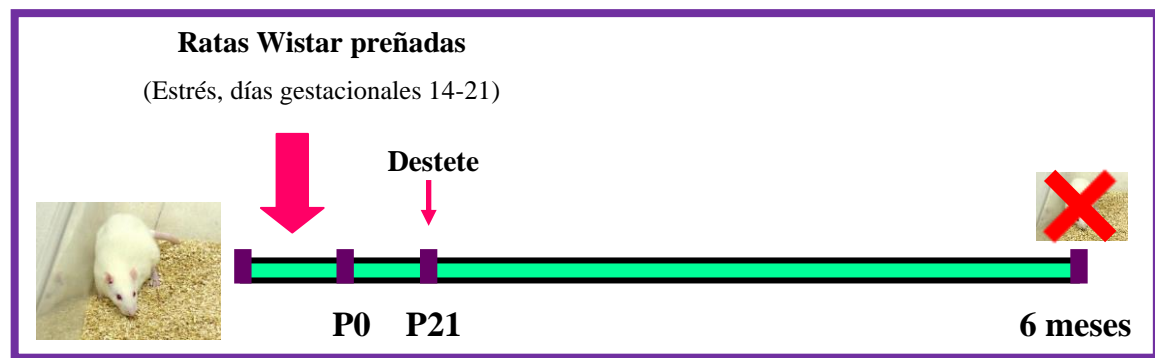
#### **2.2.1. Modelo de estrés prenatal**

##### **2.2.1.1. Diseño experimental**

Se enjaularon ratas Wistar jóvenes adultas (3 meses de edad) de forma individual durante una semana para aclimatarse al nuevo entorno. Posteriormente, se emparejó cada hembra con un macho durante un ciclo estral completo (cuatro días) para que tuviera lugar el apareamiento entre ambos. Durante estos días, se llevaron a cabo frotis vaginales de cada una de las ratas para determinar el primer día de gestación. Este día las ratas se enjaularon individualmente hasta el final del experimento.

El primer modelo empleado consistió en someter a ratas a estrés mediante restricción de movimiento. Para ello, las ratas se sometieron a estrés durante los 7 últimos días gestacionales (14-21) colocándolas en cilindros de plástico transparentes (7 cm de diámetro y 19 cm de longitud) con luz brillante durante 45 minutos, tres veces al día durante la fase oscura de los animales: 9.00, 12.00 y 17.00 (Ward y Weisz, 1980). Las ratas del grupo control se mantuvieron en sus jaulas sin ser manipuladas.

En el momento del parto las crías se mantuvieron con sus respectivas madres hasta el día del destete (día postnatal 21) y se emplearon únicamente las camadas de 9-14 crías. En el día 21 de vida los animales se distribuyen en jaulas (4 crías/jaula), separando en jaulas distintas a machos y hembras y siempre teniendo en cuenta si sus madres pertenecían al grupo control o al grupo de estresadas, es decir, si los animales habían sido estresados prenatalmente o no. En este estudio sólo se han utilizado los machos (Figura 4).



**Figura 4:** Figura representativa del modelo experimental de estrés prenatal realizado en ratas Wistar.

En resumen, este modelo experimental dio lugar a 2 grupos (n=9-10/grupo):

- 1. Grupo control (Control):** crías de madres no sometidas a ningún tipo de estrés.
- 2. Estrés prenatal (EP):** crías de madres sometidas a estrés por restricción de movimiento 45 minutos 3 veces/día durante siete días antes del nacimiento.

#### 2.2.1.2. Frotis vaginal

Para llevar a cabo el frotis vaginal y así controlar el primer día de gestación se inmovilizó el cuerpo del animal, se levantó el rabo y se introdujo en la vagina una pipeta Pasteur de plástico con una pequeña cantidad de suero. Se introdujo el suero en la vagina e inmediatamente se extrajo el suero y la pipeta. Se colocó una gota de ese suero en un portaobjetos y se observó al microscopio para identificar el momento del ciclo estral en el que se encontraba el animal y la presencia de espermatozoides. El día que se observaban espermatozoides en la preparación se consideraba el día uno de gestación.

#### 2.2.1.3. Sacrificio y recogida de las muestras

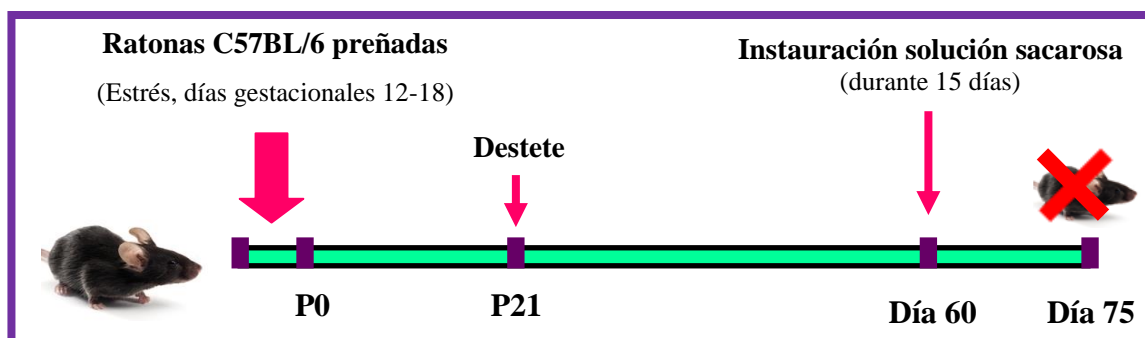
Los animales fueron sacrificados por decapitación a los 6 meses de edad, sin haber permanecido en ayunas la noche previa al sacrificio. Se extrajo rápidamente el hipocampo, el hipotálamo y la hipófisis y se mantuvieron a -80°C hasta su procesamiento.

### **2.2.2. Modelo de estrés prenatal con cambio de dieta**

#### **2.2.2.1. Diseño experimental**

Ratones hembra adultos (2 meses de edad) de la cepa C57BL/6 se agruparon para coordinar su ciclo estral. Posteriormente, estas hembras se colocaron individualmente en jaulas en presencia de un ratón macho experimentado sexualmente de la misma cepa. Se controló la presencia de tapón vaginal diariamente para determinar el primer día de gestación. Una vez observado el tapón vaginal se separó a las hembras de los machos, colocando a cada hembra individualmente, distribuyéndose en dos grupos; grupo control (n=16) y grupo de estrés (n=16) y se mantuvieron sin ser molestadas hasta el día 12 de gestación, día en que comenzó el periodo de estrés.

El estrés consistió en someter a las hembras gestantes a estrés por restricción de movimiento, colocándolas en cilindros de plástico transparentes (3,5 cm de diámetro y 10 cm de largo) y exponiéndolas a luz blanca brillante 3 veces/día (9.00, 12.00, 16.00 horas) durante 45 minutos desde el día gestacional 12 hasta el parto. En el momento del destete se distribuyeron dos animales por jaula separando machos de hembras y estresados prenatalmente de no estresados. Solamente se emplearon las camadas que tenían entre 5 y 9 crías, con distribución similar entre machos y hembras. A los 2 meses de edad (semana 9), a 8 animales de cada grupo se les suministró una solución de sacarosa al 33% en lugar de agua. Se emplearon tanto hembras como machos en los experimentos relacionados con este modelo (Figura 5).



**Figura 5:** Figura representativa del modelo experimental de estrés prenatal y sacarosa realizado en ratones de la cepa C57BL/6.



Por tanto, este modelo experimental generó 4 grupos por sexo (n=8/grupo):

1. **Grupo control + agua (CT):** crías de madres no sometidas a ningún tipo de estrés y que ingirieron agua durante toda su vida.
2. **Grupo control + sacarosa (CTS):** crías de madres no sometidas a ningún tipo de estrés y que ingirieron sacarosa desde la semana 9 hasta el sacrificio.
3. **Estrés prenatal + agua (EP):** crías de madres sometidas a estrés por restricción de movimiento durante siete días antes del nacimiento, 45 minutos 3 veces/día y que ingirieron agua durante toda su vida.
4. **Estrés prenatal + sacarosa (EPS):** crías de madres sometidas a estrés por restricción de movimiento durante siete días antes del nacimiento, 45 minutos 3 veces/día y que ingirieron sacarosa desde la semana 9 hasta el sacrificio.

#### 2.2.2.2. Control de peso, ingesta y niveles de glucosa en sangre

Durante la primera semana en la que los animales ingirieron sacarosa en lugar de agua se controló el peso, la ingesta líquida y la ingesta sólida diariamente y, posteriormente, se hizo el control cada dos días hasta el momento del sacrificio.

En el momento del sacrificio, se obtuvieron los niveles de glucosa en sangre de cada uno de los animales. Para dicha determinación, se empleó el glucómetro y las tiras reactivas ACU-Chek (Roche Diagnostics), obteniéndose la gota de sangre de la cabeza después del sacrificio.

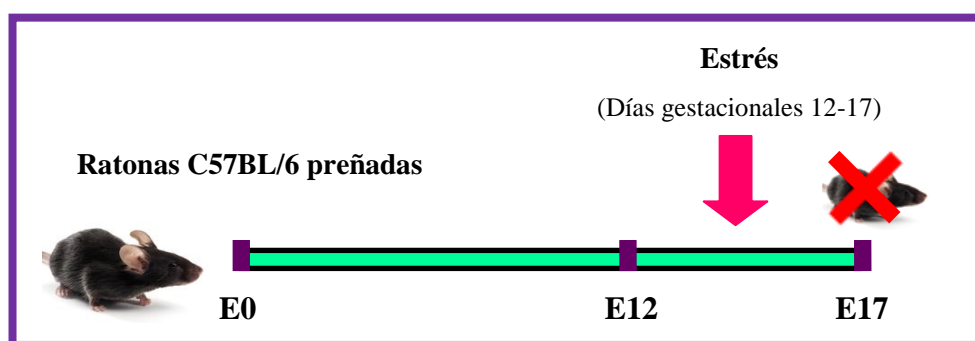
#### 2.2.2.3. Sacrificio y recogida de las muestras

Los animales se sacrificaron por dislocación cervical a los 2 meses y medio de edad, después de 15 días con la dieta enriquecida con sacarosa, sin haber permanecido en ayunas la noche previa al sacrificio. Se extrajo el hipocampo, el hipotálamo y varios tipos de tejido adiposo (tejido adiposo visceral, subcutáneo y marrón) y se mantuvieron a -80°C hasta su procesamiento. En el momento de la extracción se pesó el cerebro y los distintos tipos de tejido adiposo.

### **2.2.3. Modelo de embriones de 17 días estresados prenatalmente**

#### **2.2.3.1. Diseño experimental**

El protocolo de estrés que se siguió es el descrito anteriormente. A 5 hembras control y 5 estresadas se les extrajeron los embriones en el día gestacional 17 mediante cesárea. En estos experimentos se utilizaron tanto machos como hembras (Figura 6).



**Figura 6:** Figura representativa del modelo experimental de embriones E17 de ratón C57BL/6 estresados prenatalmente.

Por tanto, este modelo experimental generó dos grupos por sexo:

- 1. Grupo control (Control); n=18 machos y 15 hembras:** embriones de madres no sometidas a ningún tipo de estrés.
- 2. Estrés prenatal (EP); n=16 machos y 21 hembras:** embriones de madres sometidas a estrés por restricción de movimiento durante siete días antes del nacimiento, 45 minutos 3 veces/día.

#### **2.2.3.2. Genotipado de los embriones**

Para diferenciar entre machos y hembras se llevó a cabo el genotipado de los ratones. Para ello, en el momento del sacrificio se recogió un trozo del córtex cerebral de cada uno de los embriones. Se extrajo el ARN mediante el Kit Illustra RNAspin, se hizo una retrotranscripción y, posteriormente, una PCR para el gen SRY (región determinante del sexo del cromosoma Y; ver secciones extracción de ARN, transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa).

#### 2.2.3.3. Sacrificio y recogida de las muestras

Las hembras gestantes se sacrificaron por dislocación cervical en el día 17 de gestación y se les realizó una cesárea. Se extrajeron los embriones y de cada uno de ellos se extrajo el hipocampo, el hipotálamo y un trozo del córtex cerebral y se mantuvieron a -80°C hasta su procesamiento. En el momento del sacrificio se pesó a las madres gestantes.

### **3. EXTRACCIÓN DE LOS DISTINTOS TEJIDOS**

#### **3.1. EXTRACCIÓN Y DISECCIÓN DEL CEREBRO**

##### **3.1.1. Extracción del encéfalo**

Los animales del primer modelo (ratas) se sacrificaron con la guillotina entre la primera y la segunda vértebra cervical, mientras que los animales del segundo y tercer modelo (ratones) fueron sacrificados por dislocación cervical y, posteriormente, se les decapitó con una tijera. Inmediatamente después del sacrificio, se extrajo el cerebro.

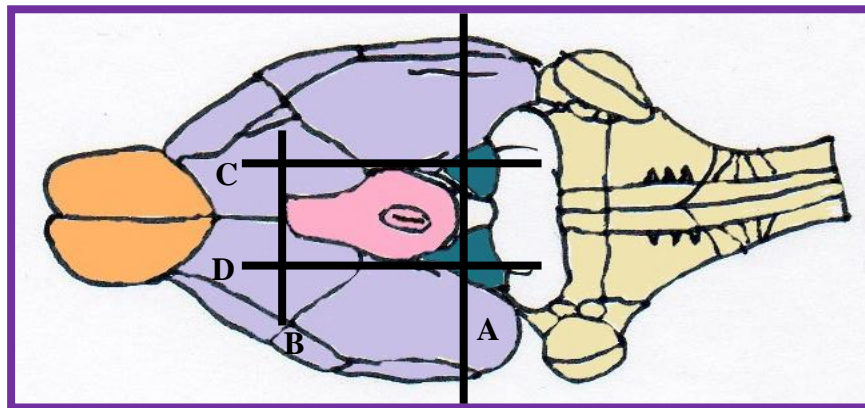
Para la extracción del encéfalo se realizó un corte longitudinal de la piel de la cabeza, desde la nuca hasta el hocico, tanto en la parte central como en los laterales y se retiró dicha piel. Posteriormente, se hizo lo mismo con el cráneo y con unas pinzas o con un hemostato se retiraron los huesos del cráneo. Una vez aislada la parte dorsal del cerebro se separó el encéfalo del resto del cerebro pasando una espátula por debajo y seccionándose los nervios olfatorios para liberar totalmente el encéfalo. El encéfalo se depositó sobre una placa de metal enfriada con hielo seco para la posterior disección de las distintas áreas cerebrales.

##### **3.1.2. Disección del cerebro para la obtención del hipotálamo, el hipocampo y la corteza**

Una vez extraído el cerebro, se procedió a la disección de la corteza, del hipotálamo y del hipocampo por el método de Glowinski e Iversen (1966).

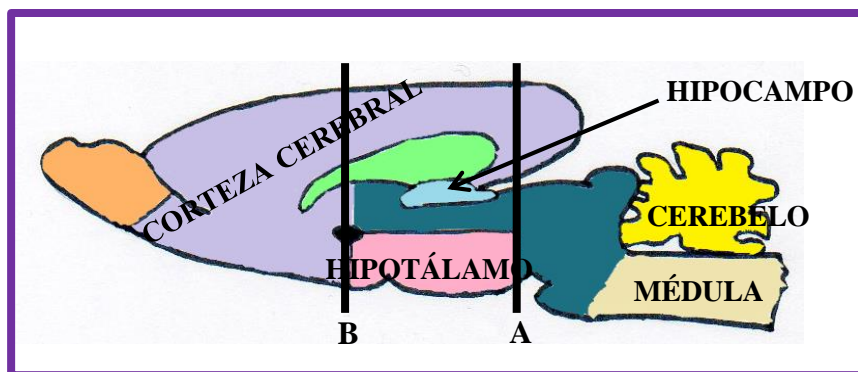
Estando el cerebro sobre la placa de metal fría y apoyado sobre su parte convexa se separó el romboencéfalo del resto del cerebro mediante una sección transversal, posterior al hipotálamo y anterior a los cuerpos mamilares (sección A). A continuación, se procedió a la extracción del hipotálamo mediante una serie de cortes que permitieron la liberación de

éste: dos cortes sagitales a ambos lados del hipotálamo (secciones C y D) y un corte anterior a la altura del quiasma óptico (sección B) (Figura 7).



**Figura 7:** Esquema representativo de la disección del hipotálamo.

Para la extracción del hipocampo se hizo un corte transversal a nivel del quiasma óptico que pasó a través de la comisura anterior dejando así aislado el cerebro medio (sección B). Se colocó el cerebro de forma que se vieran las distintas estructuras y se fue limpiando el entorno del hipocampo hasta su completo aislamiento (Figura 8).

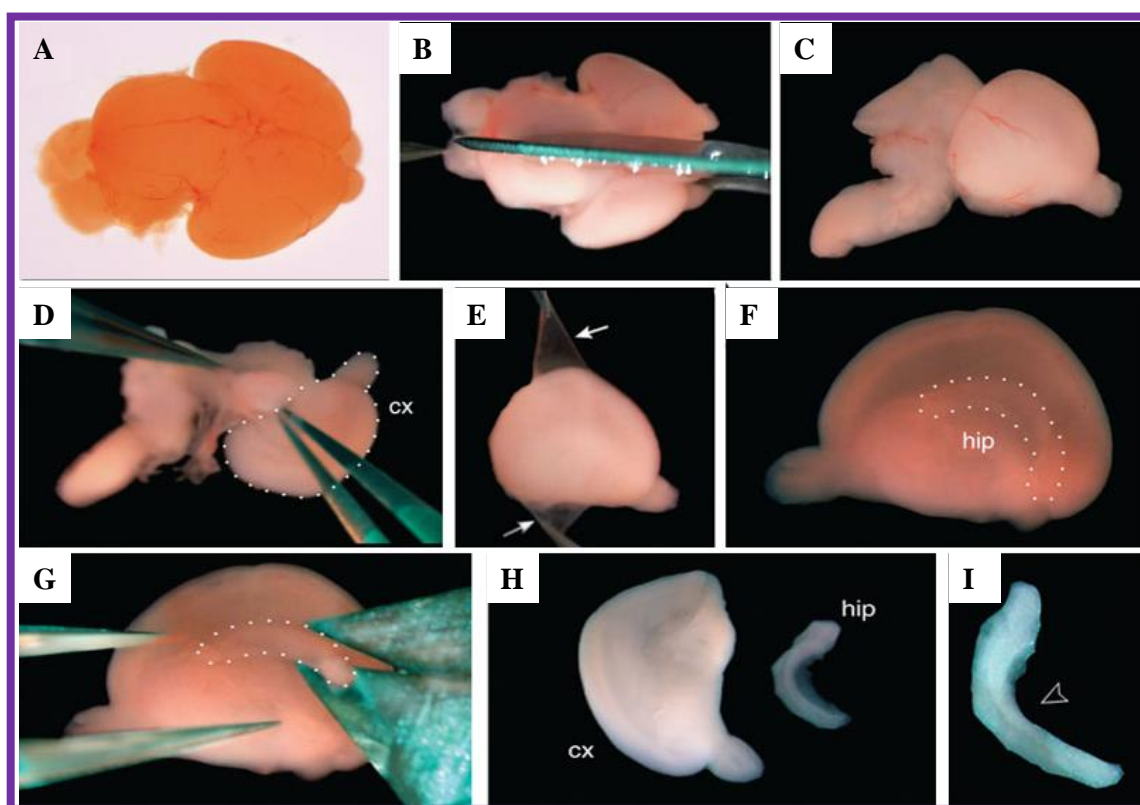


**Figura 8:** Esquema representativo de la disección del hipocampo en los animales adultos.

Para la disección de los hipocampos de los embriones E17 se colocó el cerebro con la parte ventral hacia abajo y se separaron ambos hemisferios (Figura 9A, 9B y 9C). De cada uno de los hemisferios se separó la corteza (cx) del tronco cerebral (Figura 9D). Posteriormente, se cogieron los hemisferios con una pinza por los bulbos olfatorios y con otra pinza se retiró la meninge pía madre, limpiándose completamente el hemisferio cerebral (Figura 9E). Finalmente, se colocaron los hemisferios con la parte ventral hacia

arriba y se diseccionaron ambos hipocampos (hip) (Figura 9F, 9G, 9H). En el caso de que se observe la fimbria por el lado cóncavo del hipocampo, ésta se eliminará, dejando el hipocampo lo más limpio posible (Figura 9I).

La corteza de los embriones E17 se recogió una vez diseccionados el hipotálamo y el hipocampo para el genotipado de los embriones.



**Figura 9:** Esquema representativo de la disección del hipocampo y la corteza en los embriones de 17 días. Figura modificada de Fath y cols., 2009.

### 3.1.3. Disección de la hipófisis

Una vez aislado el cerebro, se recogió la hipófisis sobre la silla turca del hueso esfenoides.

## 3.2. DISECCIÓN DE LOS DISTINTOS TIPOS DE TEJIDO ADIPOSO

### 3.2.1. Disección del tejido adiposo subcutáneo

Para la obtención del tejido adiposo subcutáneo se seccionó la piel del animal y se separó del músculo. Se obtuvo el tejido adiposo de los flancos laterales del tronco.

### **3.2.2. Disección del tejido adiposo visceral**

Una vez recogido el tejido adiposo subcutáneo se seccionó la musculatura del abdomen de los ratones y se identificó el aparato reproductor tanto de machos como de hembras. Se recogió el tejido adiposo visceral que rodeaba los testículos y conductos seminíferos en el caso de los machos y los ovarios y el útero en el caso de las hembras; es decir, se recogió el tejido adiposo visceral gonadal.

### **3.2.3. Disección del tejido adiposo marrón**

Para la obtención del tejido adiposo marrón se seccionó la piel de la nuca de los ratones y se recogió el tejido adiposo marrón que se encontraba en esa región.

## **4. PREPARACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS**

### **4.1. Obtención de la fracción proteica total**

#### **4.1.1. Reactivos de lisis**

**4.1.1.1. Tampón RIPA (Tampón de radioinmunoprecipitación; Vf=500 ml):** 4 ml tampón fosfato monosódico 0,2M, 21 ml tampón fosfato disódico  $\cdot 7H_2O$  0,2M, tritón X-100 1%, dodecil sulfato sódico (SDS) 0,1%, azida sódica 0,5%, cloruro sódico 0,1 M y agua.

- **Tampón de lisis (Vf=7 ml):** 6,7 ml de RIPA, deoxicolato sódico 0,5%, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1mM y un cocktail de inhibidor de proteasas (Roche Diagnostics).

**4.1.1.2. Tampón de Inmunoprecipitación:** EDTA 10 mM, HEPES 50 mM, pirofosfato 50 mM, fluoruro de Sodio (NaF) 0.1 M, ortovanadato sódico ( $Na_3VO_4$ ) 10 mM, 1% triton 100X, PMSF 2 mM, leupeptina 10  $\mu g/ml$  (Roche Diagnostics) y aprotinina 10  $\mu g/ml$ .

#### **4.1.2. Método**

El hipotálamo, el hipocampo y la hipófisis de ratas macho Wistar se homogeneizaron en 200 µl de tampón de lisis RIPA con un potter manual en hielo. El hipotálamo y el hipocampo de los ratones adultos se homogeneizaron en 200 µl de tampón de inmunoprecipitación y los hipocampos e hipotálamos de los embriones se homogeneizaron en 100 µl de este mismo tampón. El homogeneizado se mantuvo durante una hora en hielo y posteriormente se centrifugó a 12000 x g durante 10 minutos a 4°C, recogiendo los sobrenadantes y transfiriéndolos a nuevos tubos eppendorf que se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

#### **4.2. Cuantificación de la concentración de proteína**

La cuantificación de proteína se realizó mediante el método de Bradford (Protein Assay, Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA, Estados Unidos) siguiendo el protocolo que se recomienda en las instrucciones del producto. Brevemente, se mezclaron 2 µl de proteína con el reactivo de Bradford, se agitó la mezcla y se dejó reposar durante 5 min a t.a. Se midió la absorbancia a 595 nm con un espectrofotómetro Infinite M200 (TECAN, Grödig, Austria). La recta patrón se realizó con concentraciones crecientes (0-25 µg/µl) de BSA (albúmina de suero bovino).

### **5. ELISA PARA LA DETERMINACIÓN DE LA MUERTE CELULAR**

Este ensayo fue llevado a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante (Roche Diagnostics). Brevemente, la placa de ELISA se preparó añadiendo 100 µl de solución de revestimiento (antihistona prediluida en la solución de revestimiento) a cada uno de los pocillos y se dejó toda la noche a 4°C. Los pocillos se lavaron 3 veces con el tampón de lavado, y a continuación se añadieron 200 µl de tampón de incubación a cada pocillo durante 30 minutos a t.a. Seguidamente se lavaron y se añadieron 100 µl de las muestras diluidas durante 90 minutos. Después de lavar se añadió el anticuerpo anti-ADN peroxidasa durante 90 minutos a t.a. Finalmente, una vez lavado, se añadió el substrato de reacción y se incubó hasta que la reacción colorimétrica fue óptima, aproximadamente 15 minutos. La actividad peroxidasa se midió por absorbancia a 405 nm (y referencia 490 nm) en un lector de placas (Tecan Infinite M200). Los resultados se normalizaron con respecto

a la concentración de proteína de cada muestra.

## **6. INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS**

Las proteínas se separaron mediante electroforesis de tipo vertical en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE), según el método descrito por Laemmli (1970).

### **6.1. Reactivos**

- **T-TBS (pH 7,5):** Trizma-base 20 mM pH 7,5, NaCl 9% y tween-20 0,1%.
- **Acrilamida/bisacrilamida 37,5:1 (2.6%C).**
- **Tampón de muestras ó Tampón 2X de Laemmli (pH 6,8):** Tris-HCl 62,5 mM, SDS 2%, glicerol 25%, azul de bromofenol 0.01%,  $\beta$ -mercaptoetanol 5% y agua.
- **Tampón de electroforesis (pH 8,3):** trizma-base 25 mM pH 8,5, glicina 192 mM, SDS 0.1% y agua.
- **Tampón de transferencia (pH 8,3):** trizma-base 25 mM pH 8,5, glicina 192 mM, metanol 10% y agua.
- **Tris-HCl 1M pH 8,8**
- **Tris-HCl 1M pH 6,8**

### **6.2. Método**

- **Preparación de los geles**
  - Gel separador (8, 10 ó 12%): tris-HCl 1 M pH 8,8, SDS 10%, acrilamida/bisacrilamida 30%, persulfato amónico 10%, temed y agua.
  - Gel concentrante (4%): tris-HCl 1M pH 6,8, SDS 10%, acrilamida/bisacrilamida 30%, persulfato amónico 10%, temed y agua



- **Preparación de las muestras**

Entre 5 y 60 µg de proteína (dependiendo de la proteína a detectar), procedente de los lisados anteriormente especificados se mezcló con tampón 2X de Laemmli y se hirvió durante 5 minutos en un bloque térmico (Thermomixer Compact. Eppendorf. Hamburgo, Alemania) para su desnaturalización. Posteriormente, las muestras se centrifugaron y se guardaron a -20°C hasta su procesamiento.

- ***“Western blotting”***

Las proteínas se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida (8, 10 ó 12%, dependiendo del peso molecular de la proteína a estudiar) en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). La electroforesis se llevó a cabo en un tampón de electroforesis a t.a., a 80 V hasta que las proteínas se concentran y a continuación a 120-140 V. Posteriormente, las proteínas se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF; Bio-Rad) a 340 mA durante 90 minutos en tampón de transferencia. Una vez transferidas las proteínas a la membrana, ésta se tiñó con rojo Ponceau S (Izasa, Madrid, España) para comprobar la eficiencia de la transferencia y la carga de las proteínas. Posteriormente, se destiñó la membrana con ácido acético al 10%. Las membranas se bloquearon durante 2 horas en una solución de T-TBS con 5% de leche en polvo desnatada (Central Lechera Asturiana, Asturias, España), excepto para ensayos de proteínas fosforiladas, en las cuales el bloqueo se realizó con T-TBS y 5% BSA. Una vez bloqueados los sitios de unión inespecíficos, la membrana se incubó con los anticuerpos primarios diluidos en el mismo tampón en el que se realizó el bloqueo a una concentración de 1:1000 durante toda la noche a 4°C. Los anticuerpos empleados se detallan en la tabla (Tabla 1). Al día siguiente, tras retirar el anticuerpo primario, se realizaron tres lavados con T-TBS de 15 minutos y la membrana se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente (anti-inmunoglobulina G de cabra, ratón o conejo) conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) a una concentración de 1:2000 (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, Estados Unidos) durante 90 minutos a t.a., en agitación y se realizaron tres lavados de 15 minutos con T-TBS. Finalmente, la actividad peroxidasa fue visualizada por quimioluminiscencia (immune-star western chemiluminiscent kit; Bio-Rad) y la cuantificación densitométrica se llevó a cabo con un sistema de análisis de imagen (Kodak Gel Logic 1500) y su correspondiente software de imagen molecular, versión 4.0 (Rochester, NY, Estados Unidos). Para cada ensayo, los resultados se normalizaron

mediante la rehibridación del mismo con la forma total de la proteína y con Glicerualdehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH; AnaSpec).

<b>ANTICUERPO PRIMARIO</b>	<b>REFERENCIA Y CASA COMERCIAL</b>	<b>ESPECIE</b>
<b>Bax (Anti-Rat) Ab-3 (Clone1D1)</b>	#MS-713-P0; Thermo Scientific (Cheshire, UK)	<b>Ratón</b>
<b>Bcl-2α (Anti-Mouse) Ab-4 (Clone 10C4)</b>	#MS-598-P0; Thermo Scientific	<b>Ratón</b>
<b>Calpaina-2 (m-Calpaina) Subunidad larga</b>	AB81013; Chemicon International (Temecula, CA)	<b>Conejo</b>
<b>Calpastatina</b>	Sc-20779; Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)	<b>Conejo</b>
<b>Caspasa-9; Clone 5B4</b>	M054-3; Medical Biological Laboratories (Woburn, MA)	<b>Ratón</b>
<b>Caspasa-8 (FLICE) Ab-4</b>	RB-1200-P0; Neomarkers (Fremont, CA),	<b>Conejo</b>
<b>Fosfo-CREB-1 (Ser 133)</b>	Sc-7978; Cell Signalling Technology	<b>Cabra</b>
<b>CREB (48H2)</b>	#9197; Cell Signalling Technology	<b>Conejo</b>
<b>GAPDH</b>	54593; AnaSpec, San Jose, CA	<b>Conejo</b>
<b>GFAP (Clone G-A-5)</b>	G 3893; Sigma-Aldrich	<b>Ratón</b>
<b>Fosfo-p53 (Ser15)</b>	#9284; Cell Signalling Technology (Beverly, MA)	<b>Conejo</b>
<b>p53 Ab-1 (PAb 240)</b>	MS-104-P1; Neomarkers	<b>Ratón</b>
<b>PCNA (Clone PC10)</b>	523-01; Signet (Dedham, MA, Estados Unidos)	<b>Ratón</b>
<b>TUJ-1</b>	MAB1195; R&D Systems (Minneapolis, MN, Estados Unidos)	<b>Ratón</b>

**Tabla 1:** Anticuerpos primarios empleados para el *Western Blotting*. Se especifica el número de catálogo, la casa comercial y el animal del que proviene cada anticuerpo. Bax: proteína X asociada a Bcl-2; Bcl-2: Proteína del linfoma de células B; CREB: proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc; GAPDH: glicerualdehido-3-fosfato deshidrogenasa; GFAP: proteína acídica fibrilar glial; PCNA: antígeno nuclear de proliferación celular; Tuj-1: β-III tubulina.

## **7. ANÁLISIS DE ARN mensajeros**

### **7.1. Extracción de ARN con el reactivo TriReagent**

#### **7.1.1. Reactivos**

TriReagent, Cloroformo, isopropanol, etanol 75% y agua libre de ARNasas (Braun, Melgungen, Alemania).

#### **7.1.2. Método**

El ARN total se extrajo de acuerdo al protocolo del reactivo TriReagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos). Una vez aislados el hipocampo, el hipotálamo y la hipófisis se homogeneizaron con un potter en 1 ml de trizol y se incubaron a t.a. durante 5 min para permitir la completa disociación de los complejos de nucleoproteínas. Posteriormente, se añadieron 200 µl de cloroformo, se agitaron vigorosamente las muestras y se incubaron para la sedimentación del homogenado a t.a. durante 15 min. Transcurrido este periodo de tiempo se centrifugaron las muestras a 12000 x g durante 15 min a 4°C y se transfirió el sobrenadante o fase acuosa a nuevos tubos eppendorf estériles. Para precipitar el ARN se añadieron 500 µl de isopropanol, se incubaron las muestras durante 10 min a t.a. y se centrifugaron a 12000 x g durante 15 min a 4°C. Una vez desechados los sobrenadantes se lavaron los “pellets” con 1 ml de etanol al 75% y se centrifugaron a 7500 x g durante 5 min a 4°C. Se eliminaron los sobrenadantes, se dejaron secar los “pellets” y se resuspendió el ARN en agua libre de ARNasas.

### **7.2. Extracción de ARN con el Kit Illustra RNAspin**

#### **7.2.1. Reactivos**

Reactivos del kit (Illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit (GE Healthcare; Buckinghamshire, UK; Ref. 25-0500-72), β-mercaptoetanol, etanol 70% y etanol absoluto, glucógeno 20 mg/ml (Roche) y cloruro de Litio 4 M.

### **7.2.2. Método**

Por este método se extrajo el ARN del hipotálamo de los ratones del modelo de estrés prenatal y cambio de dieta y el hipocampo y el hipotálamo de los embriones E17 estresados prenatalmente.

Las muestras se homogeneizaron en 350 µl de tampón de lisis (350 µl de RA1 + 3,5 µl de β-mercaptoetanol), se transfirieron a una columna y se centrifugó durante 1 min a 11000 x g a t.a. para filtrar el lisado. Una vez centrifugado se desechó la columna y se añadieron 350 µl de etanol al 70% para permitir la unión del ARN a la columna. La mezcla se transfirió a una segunda columna y se centrifugó 30 s a 8000 x g a t.a. Se desechó el líquido del eppendorf ya que el ARN se encuentra pegado en esta segunda columna, se añadió a la columna 350 µl de MDB (tampón para desalar la membrana) y se centrifugó durante 1 min a 11000 x g a t.a. para secar la membrana. Una vez desechado el líquido del eppendorf se añadieron 95 µl de la solución de ADNasa (10 µl de ADNasa + 90 µl del tampón de reacción para ADNasa) en el centro de la membrana de la columna y se dejó actuar durante 15 min a t.a. Transcurridos los 15 min se realizaron varios lavados añadiendo 200 µl del tampón de lavado RA2 para el lavado 1, 600 µl de RA3 para el lavado 2 y 250 µl de RA3 para el lavado 3, después de los dos primeros lavados se centrifugó 1 min a 11000 x g a t.a. y 2 min a 11000 x g a t.a. después del tercer lavado. En el primer lavado el buffer RA2 también sirvió para inactivar la ADNasa I. Finalmente, se añadieron 100 µl de agua libre de ARNasas y se centrifugó 1 min a 11000 x g a t.a. para desprender el ARN de la columna.

En el caso de muestras con poca cantidad de ARN después de la extracción se llevó a cabo la precipitación del ARN. Para ello, se añadió 1 µl de glucógeno 20 mg/ml, 10 µl de cloruro de litio 4M y 250 µl de etanol absoluto, se guardaron las muestras a -20°C durante 30 min y posteriormente, se centrifugó 15 min a 12000 x g a 4°C. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió el “pellet” en 10 µl de agua libre de ARNasas.

## **7.3. Extracción de ARN con el reactivo Quiazol**

### **7.3.1. Reactivos**

Quiazol (Quiagen, Maryland, Estados Unidos), etanol 70%, cloroformo y los reactivos del kit de extracción de ARN de tejido adiposo (QIAGEN, n° cat. 74804).

### **7.3.2. Método**

Se colocaron las muestras de tejido adiposo marrón en un tubo eppendorf y se les añadió un mililitro de Qiazol. Se disgregó el tejido por tracción mecánica empleando el molino mezclador MM 400 (Retsch, Haan, Alemania) durante 15 s a una frecuencia de 30 Hz, se repitió el proceso hasta que el tejido estuvo completamente homogeneizado, manteniendo las muestras en hielo entre cada una de las repeticiones. Posteriormente, se incubó a t.a. durante 5 min, se añadieron 200 µl de cloroformo y se agitó fuertemente con la mano durante 15 s. Después de incubar 3 min a t.a. se centrifugó a 12000 g durante 15 min a 4°C y se transfirió la fase acuosa donde se encuentra el ARN a nuevos tubos. A esta fase acuosa se le añadió un volumen de etanol 70 % y se vorteoó durante 4-5 s para posteriormente, transferir 700 µl de la muestra a una columna del Kit y centrifugar a 8000 g durante 1 min a t.a. Se repitió el paso anterior con el resto de la muestra y se desechó el líquido del tubo colector. Se añadieron 700 µl de tampón RW1 y 500 µl de tampón RPE a la columna y se centrifugó a 8000 g durante 1 min a t.a. después de la adición de cada uno de los reactivos. Se añadieron otros 500 µl de tampón RPE a la columna y se centrifugó a 8000 g durante 3 min a t.a.

Finalmente, se transfirió la columna a un tubo y se añadieron 30 µl de agua libre de ARNasas. Se incubó durante 1 min a t.a. y se centrifugó durante 1 min a t.a. El volumen obtenido de la centrifugación es el ARN purificado.

### **7.4. Cuantificación de la concentración de ARN**

La concentración total de ARN se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm en un nanodrop (Nanodrop-1000, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, Estados Unidos).

### **7.5. Transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa**

#### **7.5.1. Transcripción inversa (RT)**

Una vez cuantificada la cantidad de ARN que tenía cada una de las muestras se llevó a cabo la retrotranscripción o transcripción inversa para la síntesis de ADN. Se sintetizó ADNc a partir de 2 µg de ARN total utilizando un kit comercial (high capacity cDNA reverse transcription kit; Applied Biosystems; Foster City, CA, Estados Unidos) y

siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se mezclaron los reactivos del kit (10X tampón de transcripción inversa, 25X dNTPs 100 mM, 10X random primers, transcriptasa inversa, inhibidor de ARNasas y agua libre de ARNasas) en las proporciones adecuadas y se mezcló éste con una cantidad igual de ARN (2 µg) y agua, se centrifugó suavemente para eliminar las burbujas y se introdujeron las muestras en un termociclador (Tetrad 2 Peltier Thermal Cycler, Bio-Rad). El proceso de retrotranscripción se llevó a cabo en las siguientes condiciones: 10 min a 25°C, 120 min a 37°C y 5 min a 85°C. Las muestras se mantuvieron a 4°C hasta la realización de la PCR.

### **7.5.2. Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (RT-PCR)**

La PCR cuantitativa a tiempo real se llevó a cabo con ensayos de expresión de Applied Biosystems para cada uno de los genes en un sistema de detección de secuencia ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems). Los genes de expresión empleados se recogen en la tabla 2. Se mezcló la cantidad correspondiente de Tampón de PCR (TaqMan Universal PCR Master Mix), de “primers” para cada gen y de ADNc, se centrifugó y se introdujo la placa en el termociclador para que tuviera lugar la reacción. Los valores se normalizaron mediante GAPDH. Los niveles de expresión relativos se determinaron por el método  $\Delta\Delta C_T$ . Las condiciones de la reacción fueron las siguientes:

- Paso inicial: activación UNG 2 min a 50°C + 10 min a 95°C.
- 40 ciclos, cada uno de ellos con dos fases: desnaturalización 15 s a 95°C y extensión 1 min a 60°C.

SONDA	Nº Catálogo	SONDA	Nº Catálogo
<b>AgRP</b>	Mm 01431703	<b>POMC</b>	Rn 00595020 Mm 00435874
<b>CART</b>	Mm 04210469	<b>PRL</b>	Rn 00561791
<b>FSH</b>	Rn 01484594	<b>Receptor Glucocorticoides</b>	Mm 00433832
<b>GAPDH</b>	Rn 99999916/ 4352339E	<b>Receptor IGF-I</b>	Mm 00802831
<b>GH</b>	Rn 01495894	<b>SRY</b>	Mm 00441712
<b>IGF-I</b>	Rn 99999087/ Mm 00439561	<b>TSH</b>	Rn 00565424
<b>LH</b>	Rn 00563443	<b>UCP-1</b>	Mm 01244861
<b>NPY</b>	Mm 03048253		

**Tabla 2:** Sondas de expresión empleadas para la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (RT-PCR). Rn-“Rattus norvegicus”, rata; Mm-“Mus musculus”, ratón común. AgRP: péptido relacionado con la proteína agouti; CART: transcrito regulado por cocaína y anfetamina; FSH: hormona foliculoestimulante; GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; GH: hormona de crecimiento; IGF-I: factor de crecimiento similar a insulina tipo I; LH: hormona luteinizante; NPY: neuropéptido Y; POMC: proopiomelanocortina; PRL: prolactina; SRY: región determinante del sexo del cromosoma Y; TSH: hormona estimulante del tiroides o tirotrópina; UCP-1: proteína desacoplante 1.

## 8. DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS EN SUERO

### 8.1. Ensayo Inmunoenzimométrico (IEMA) para la determinación del Factor de Crecimiento similar a la Insulina tipo I (IGF-I)

La determinación cuantitativa de IGF-I circulante se realizó mediante un ensayo inmunoenzimométrico (IEMA) de IDS, Immunodiagnostic Systems Limited (Baldon, Tyne & Wear, Reino Unido) desarrollado en asociación con Novozymes Biopharma AU Limited (Therbarston, Australia). Las muestras pre-tratadas, para separar el IGF-I de las proteínas de unión que lo transportan, y diluídas se incubaron con un anticuerpo policlonal de conejo biotinilado anti-rata IGF-I durante 2 horas a t.a. y en agitación. Después de lavar los pocillos tres veces con 200 µl de tampón de lavado se añadieron 200 µl del complejo avidina-peroxidasa y se incubó durante 30 min a t.a. Después de lavar de nuevo tres veces

con 200 µl de tampón de lavado, se añadió el sustrato cromogénico (tetrametil-benzidina) y se incubó durante 30 min a t.a., transcurrido este tiempo se añadieron 100 µl de la solución encargada de parar la reacción y se midió la absorbancia en un lector de placas (Tecan InfiniteM200) a 450 nm, con una referencia de 650 nm, siendo la intensidad de color directamente proporcional a la cantidad de IGF-I presente en la muestra. El límite de sensibilidad del ensayo fue de 63 ng/ml. Los coeficientes de variación intra e inter-ensayo fueron de 6,8% y 7,3%, respectivamente.

### **8.2. Análisis colorimétrico para la detección de los niveles séricos de triglicéridos (TG), colesterol total (C-T), HDL colesterol (HDL-c), LDL colesterol (LDL-c), proteínas totales, lípidos totales y glicerol**

Los niveles séricos de triglicéridos, colesterol total, lipoproteínas de alta densidad (HDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL), proteínas totales y lípidos totales fueron medidos utilizando kits comerciales procedentes de SpinReact (Sant Esteve de Bas, Gerona, España), los niveles de glicerol fueron medidos con un kit procedente de Sigma, siguiendo las indicaciones del fabricante. Todos los ensayos se realizaron en placas de 96 pocillos (Sterilin, Sttafordshire, Reino Unido) y se midió la absorbancia en un lector de placas (Tecan InfiniteM200) a la longitud de onda indicada en cada caso.

**8.2.1. Determinación cuantitativa de triglicéridos:** La determinación se realizó mediante la reacción de 2 µl de suero con un reactivo compuesto por distintas enzimas, lipoproteín-lipasa, glicerol quinasa, glicerol-3-oxidasa, peroxidasa, 4-aminofenazona y Adenosin trifosfato. La mezcla se incubó durante 10 minutos a t.a. en agitación, y se midió la absorbancia en un lector de placas a 505 nm, siendo la intensidad de color proporcional a la concentración de triglicéridos presentes en la muestra ensayada. Se determinó la concentración de triglicéridos de la muestra mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Absorbancia muestra}}{\text{Absorbancia patrón}} \times 200 (\text{Concentración Patrón}) = \text{mg/dl de triglicéridos}$$



**8.2.2. Determinación cuantitativa de colesterol:** La determinación se realizó mediante la reacción de 2 µl de suero con un reactivo compuesto por colesterol esterasa, colesterol oxidasa, peroxidasa, fenol, 4-Aminofenazona y PIPES pH 6,9. La mezcla del suero con el reactivo se incubó 10 min en agitación y a t.a. y se midió la absorbancia en un lector de placas a 505 nm, siendo la intensidad de color proporcional a la concentración de colesterol presente en la muestra ensayada. Se determinó la concentración de colesterol de la muestra mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Absorbancia muestra}}{\text{Absorbancia patrón}} \times 200 (\text{Concentración patrón}) = \text{mg/dl de colesterol}$$

**8.2.3. Determinación cuantitativa de colesterol HDL y LDL:** La determinación de HDL o LDL colesterol se realizó en dos etapas. Un primer paso en el que se eliminaron las lipoproteínas no-HDL o no-LDL, respectivamente, y un segundo paso en el que se llevó a cabo la medición del HDL o LDL. Para el ensayo de HDL se mezcló 1,5 µl de suero con un reactivo que contenía ácido N,N-bis (2-hidroxietil)-2- aminoetanosulfónico pH 6,6, N-(2-hidroxi-3 sulfopropil)-3,5-dimetoxianilina, colesterol esterasa, colesterol oxidasa, catalasa y ascórbico oxidasa y para el ensayo de LDL se mezcló 2 µl de suero con un reactivo compuesto por PIPES pH 7,0, colesterol esterasa, colesterol oxidasa, catalasa, N-Etil-N- (2-hidroxi-3-sulfopropil)-3-metilanilina. Tras una incubación de 5 min en agitación a 37°C se añadió un segundo reactivo que contenía ácido N,N-bis (2-hidroxietil)-2- aminoetanosulfónico pH 7,0, 4-Aminoantipirina y peroxidasa para el ensayo de HDL y para el ensayo de LDL, PIPES pH 7,0, 4-Aminoantipirina y peroxidasa. Se incubó de nuevo durante 5 min en agitación a 37°C y se midió la absorbancia en un lector de placas a 650 nm para el ensayo de HDL y a 600 nm para el ensayo de LDL, siendo la intensidad de color proporcional a la concentración de HDL o LDL colesterol presente en la muestra ensayada. Se determinó la concentración de colesterol de la muestra mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{\Delta \text{ Absorbancia muestra}}{\Delta \text{ Absorbancia calibrador}} \times 46 (\text{Concentración calibrador}) = \text{mg/dl de HDL colesterol}$$

$$\frac{\text{Absorbancia muestra}}{\text{Absorbancia Patrón}} \times 92 \text{ (Concentración Patrón)} = \text{mg/dl de LDL colesterol}$$

**8.2.4. Determinación cuantitativa de proteínas totales:** La determinación se realizó mediante la reacción de 5 µl de suero con un reactivo compuesto por potasio sodio tartrato, yoduro sódico, yoduro de potasio y sulfato de cobre (II). La mezcla del suero con el reactivo se incubó en agitación durante 10 min a t.a. y se midió la absorbancia en un lector de placas a 540 nm, siendo la intensidad de color proporcional a la concentración de colesterol presente en la muestra ensayada. Se determinó la concentración de proteínas totales de la muestra mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Absorbancia muestra}}{\text{Absorbancia Patrón}} \times 7 \text{ (Concentración Patrón)} = \text{gr/dl de proteínas totales}$$

**8.2.5. Determinación cuantitativa de lípidos totales:** La determinación se realizó mediante dos pasos, en el primero de ellos se mezcló 1 µl de suero con ácido sulfúrico y se incubó 10 min en un baño de agua hirviendo. Posteriormente, se mezclaron 20 µl de la preparación anterior con un reactivo compuesto por fosfovainillina y se incubó durante 15 min a 37°C y se midió la absorbancia en un lector de placas a 520 nm, siendo la intensidad de color proporcional a la concentración de colesterol presente en la muestra ensayada. Se determinó la concentración de lípidos totales de la muestra mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Absorbancia muestra}}{\text{Absorbancia calibrador}} \times 750 \text{ (Concentración calibrador)} = \frac{\text{mg/dl de lípidos}}{\text{totales}}$$

**8.2.6. Determinación cuantitativa de glicerol:** La determinación se realizó mediante la reacción de 2,5 µl de suero con un reactivo compuesto por sal de magnesio, 4-aminoantipirina, N-etil-N-(3 sulfopropil) m-anisidina, glicerol quinasa, glicerol fosfato oxidasa, peroxidasa, azida sódica y tampón. La mezcla del suero con el reactivo se incubó en agitación durante 5 min a 37°C y se midió la absorbancia en un lector de placas a 540 nm, siendo la intensidad de color proporcional a la concentración de colesterol presente en la muestra ensayada. Se determinó la concentración de glicerol de la muestra mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{(\text{Abs muestra} - \text{Abs blanco})}{(\text{Abs estándar} - \text{Abs blanco})} \times 0,26 (\text{Concentración Stándar}) = \text{mg/ml de glicerol}$$

### **8.3. Inmunoensayo múltiple en suspensión (Tecnología Luminex; BioPlex)**

Los niveles séricos de leptina, insulina y corticosterona de los ratones estresados prenatalmente y sometidos a un cambio de dieta se llevaron a cabo mediante Bioplex (Millipore, Billerica, MA, Estados Unidos). El método se llevó a cabo según las instrucciones del producto, brevemente, se incubaron las microesferas fluorescentes conjugadas con el anticuerpo específico y el suero durante 18 horas a 4°C. Transcurrido ese periodo, se lavaron los pocillos, se añadió el anticuerpo conjugado con biotina y se incubó durante 30 min a t.a. Posteriormente, se añadió la estreptavidina conjugada con ficoeritrina y se incubó de nuevo 30 min a t.a. Finalmente, después de lavar los pocillos con tampón de lavado se resuspendieron las muestras con el tampón adecuado. Los resultados se leyeron con un sistema de matriz de suspensión Bio-Plex 200 (Bio-Rad Laboratories). Las concentraciones de cada parámetro se analizaron utilizando el programa Bio-Plex Manager 4.1 (Bio-Rad Laboratories). Los coeficientes de variación intra e inter-ensayo fueron de <4,5% y <10,3% respectivamente para leptina e insulina y para corticosterona <15% y <7% respectivamente.

## **9. ÍNDICES ATEROGÉNICOS**

En el modelo de estrés prenatal e ingesta de sacarosa en la vida adulta se evaluaron los siguientes índices cardiometabólicos: índices aterogénicos de Castelli I (C-T/HDL-c) y II (LDL-c/HDL-c), y el cociente TG/HDL-c. Los índices de Castelli se utilizan para el análisis de riesgo coronario en la presencia de factores de riesgo cardiovascular (Castelli, 1988; Pinheiro y cols., 2009). Y el cociente TG/HDL-c se asocia al riesgo cardiovascular dado por la resistencia a la insulina (Reaven, 2002; Pinheiro y cols., 2009).

## **10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Para el análisis estadístico se empleó el programa estadístico SPSS 15.0 (Windows; SPSS Inc., Chicago, IL, Estados Unidos) y el programa estadístico GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA. Estados Unidos). Los resultados fueron considerados estadísticamente significativos con un valor de la  $P < 0,05$ . El análisis estadístico llevado a

cabo para cada uno de los modelos experimentales empleados en el estudio fue el siguiente:

Para el estudio comparativo entre las ratas macho control y las ratas macho estresadas prenatalmente se utilizó un análisis de t-de Student de dos colas.

Para el análisis de los distintos parámetros de los embriones estresados de 17 días se llevó a cabo un ANOVA (análisis de la varianza) de dos vías para conocer cuál de los dos parámetros (estrés prenatal y sexo) tenía efecto y si existía interacción entre ambos. Posteriormente, se procedió a llevar a cabo el ANOVA de una vía y los análisis por t-Student permitidos. El ANOVA de una vía fue seguido por un test *post-hoc* de Newman-Keuls.

Para el análisis del efecto del estrés prenatal en la respuesta metabólica a una dieta rica en sacarosa se llevó a cabo un ANOVA de tres vías para conocer cuál de los parámetros (estrés prenatal, ingesta de sacarosa y sexo) tenía efecto y si existía interacción entre alguno de ellos. Posteriormente, se procedió a llevar a cabo el ANOVA de una vía y los análisis por t-Student permitidos. El ANOVA de una vía fue seguido por un test *post-hoc* de Newman-Keuls. El análisis del peso semanal, fue analizado con un ANOVA de medidas repetidas.

Finalmente, para el análisis del efecto del estrés prenatal en el recambio celular en el eje hipocampo-hipotálamo-hipofisario de ratones alimentados con una dieta rica en sacarosa se llevó a cabo un ANOVA de dos vías para conocer cuál de los parámetros (estrés prenatal e ingesta de sacarosa) tenía efecto y si existía interacción entre ambos en cada uno de los sexos. Posteriormente, se llevó a cabo un ANOVA de una vía para cada uno de los sexos, seguido por un test *post-hoc* de Newman-Keuls para conocer el efecto del estrés prenatal y la ingesta de sacarosa.

Las proteínas o ARNs de cada animal se analizaron por separado. La letra n representa el número de animales usado en cada grupo. Todos los datos se normalizaron con respecto a los valores control de cada ensayo y se muestran como el valor de la media  $\pm$  el error estándar de la media (e.e.m.). Solamente se representan en las figuras las diferencias significativas fisiológicas.

## **RESULTADOS**



## RESULTADOS

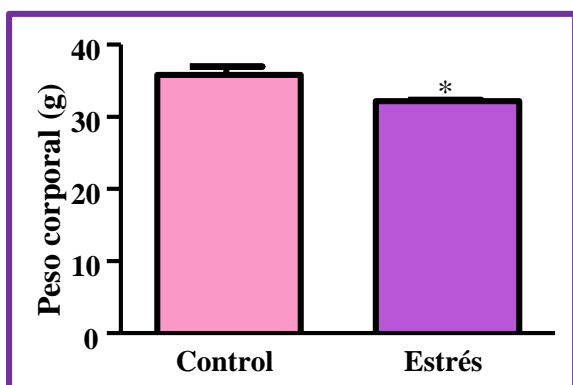
### 1. EFECTO DEL ESTRÉS PRENATAL EN EDAD EMBRIONARIA Y EN EDAD ADULTA

#### 1.1. EFECTO DEL ESTRÉS PRENATAL EN EL HIPOCAMPO Y EL HIPOTÁLAMO DE EMBRIONES DE RATÓN DE 17 DÍAS, MACHOS Y HEMBRAS

##### 1.1.1. Efecto del estrés prenatal sobre el peso corporal de la madre y el número de embriones.

El peso corporal de las madres estresadas en el día del sacrificio (día gestacional 17) era 3,6 g menor que el de las hembras control, que se habían mantenido sin ser molestadas durante toda la gestación (Control:  $35,8 \pm 1,2$  g; Estrés:  $32,2 \pm 0,2$  g;  $P < 0,05$ ) (Figura 10).

También se comprobó si el estrés tenía algún efecto sobre el número de embriones que tenía cada madre, no encontrándose diferencias entre las control y las estresadas (Control:  $6,8 \pm 1,0$  crías; Estrés:  $7,4 \pm 0,9$  crías). El balance sexo/camada tampoco fue diferente entre los animales control y los animales estresados, ya que, se obtuvieron  $3,6 \pm 0,7$  embriones macho y  $3,0 \pm 0,7$  embriones hembra procedentes de las madres control y  $3,2 \pm 0,9$  embriones macho y  $4,2 \pm 1,0$  embriones hembra procedentes de las madres estresadas.

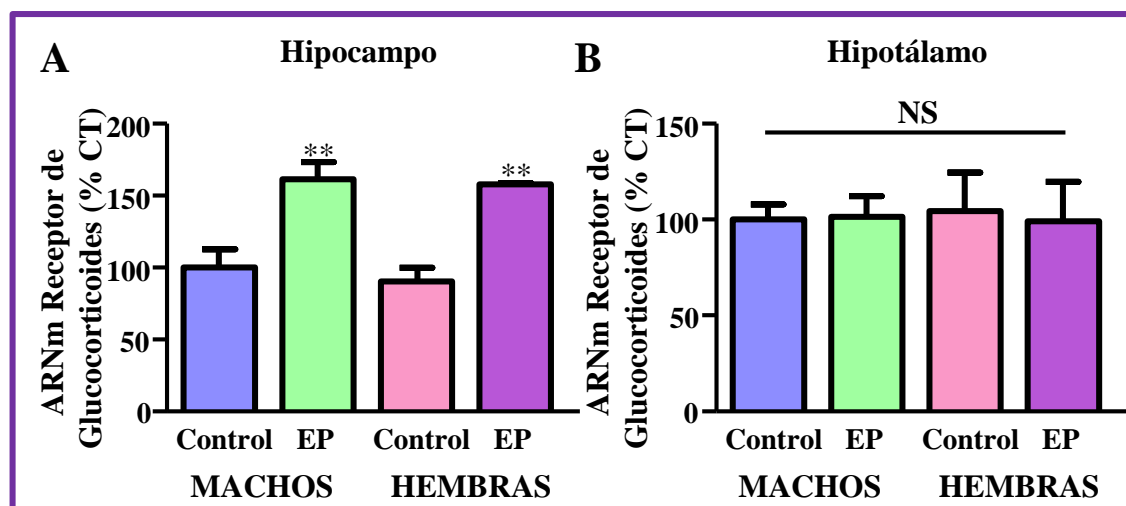


**Figura 10:** Peso corporal (g) de las madres control y estresadas en el día del sacrificio (día gestacional 17). Los resultados se expresan como medias  $\pm$  e.e.m. **t-Student:** \*  $P < 0,05$ .  $n=5$ /grupo.

### 1.1.2. Efecto del estrés prenatal sobre los niveles de ARNm del receptor de glucocorticoides.

Se midieron los niveles de ARNm del receptor de glucocorticoides en el hipocampo y el hipotálamo de los embriones, tanto en machos como en hembras. Se observó un efecto del estrés prenatal ( $F_{(1,15)}: 22,81; P<0,001$ ), pero no del sexo sobre los niveles de ARNm del receptor de glucocorticoides en el hipocampo, sin interacción entre ambos factores. Los ratones estresados, tanto machos como hembras, tenían mayores niveles del receptor de glucocorticoides que los ratones control (Figura 11A).

En el hipotálamo, sin embargo, no se encontró efecto ni del estrés prenatal, ni del sexo, ni interacción entre ambos factores, no existiendo diferencias entre los distintos grupos en estudio (Figura 11B).



**Figura 11:** Niveles relativos de ARNm del receptor de glucocorticoides en el hipocampo (A) y el hipotálamo (B) de ratones control y ratones estresados prenatalmente (EP), machos y hembras a día embrionario 17. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  e.e.m normalizados respecto a los valores de los machos control. ANOVA: hipocampo ( $P<0,01$ ); hipotálamo (NS: no significativo); \* estadísticamente significativo respecto al grupo control del mismo sexo.  $n=3-7$ /grupo.

### 1.1.3. Efecto del estrés prenatal sobre los neuropéptidos hipotalámicos implicados en la regulación de la ingesta.

Se estudiaron mediante RT-PCR los niveles de ARNm de varios péptidos implicados en el control de la ingesta, NPY y AgRP como péptidos orexigénicos, y POMC y CART como péptidos anorexigénicos.



### **1.1.3.1. Niveles de ARNm de NPY y AgRP**

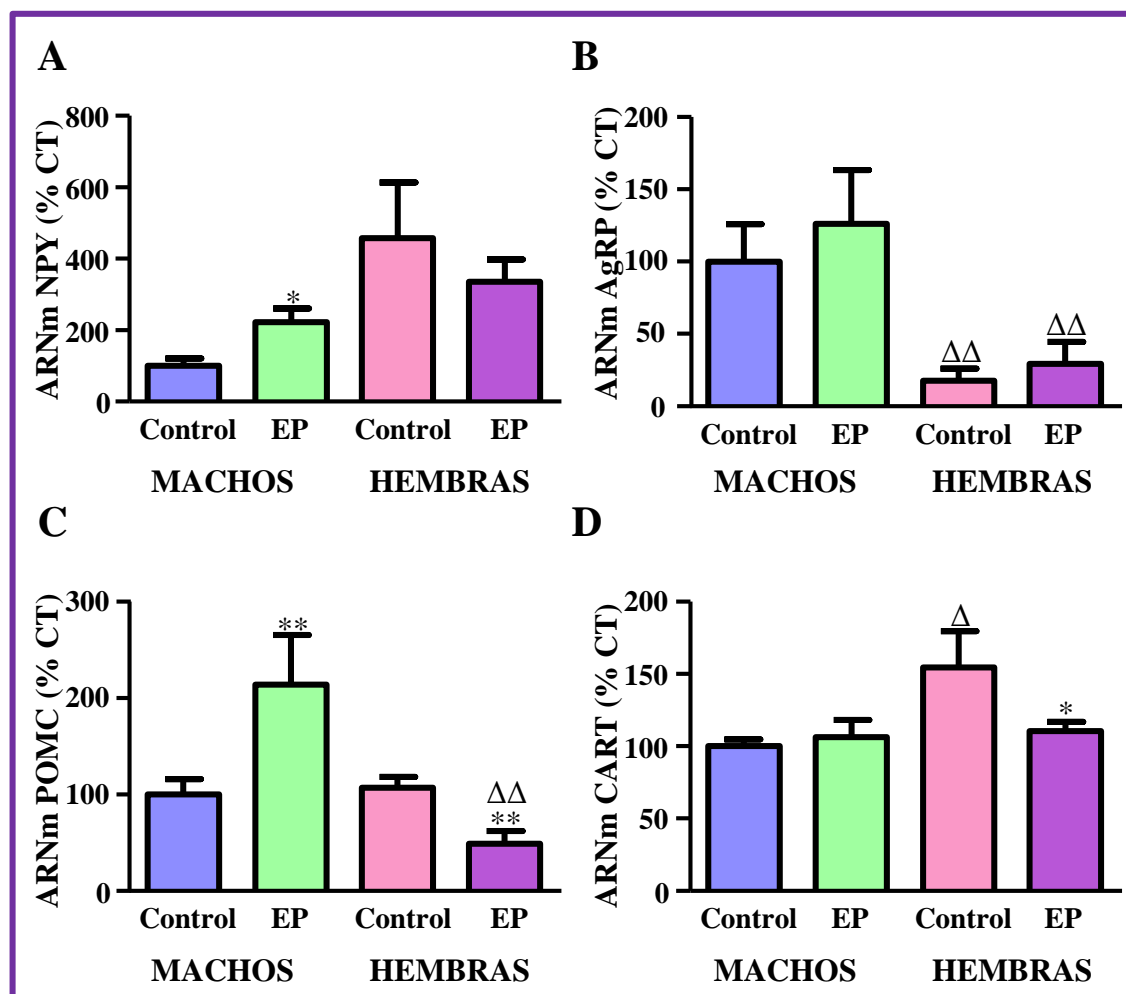
Los niveles del péptido orexigénico NPY estaban afectados por el sexo ( $F_{(1,22)}$ : 6,01;  $P<0,05$ ), pero no por el estrés prenatal, sin existir interacción entre ambos factores. Los machos estresados tenían mayores niveles de NPY que los controles, sin existir diferencias en las hembras (Figura 12A).

Los niveles del péptido orexigénico AgRP estaban afectados por el sexo ( $F_{(1,22)}$ : 16,17;  $P<0,001$ ), pero no por el estrés prenatal, sin existir interacción entre ambos factores. Se observó que tanto las hembras control como las estresadas tenían menores niveles de AgRP que los machos control y estresados respectivamente (Figura 12B).

### **1.1.3.2. Niveles de ARNm de POMC y CART**

Los niveles de ARNm del péptido anorexigénico POMC se encontraban afectados por el sexo ( $F_{(1,22)}$ : 8,47;  $P<0,01$ ), pero no por el estrés prenatal, existiendo una interacción entre ambos factores ( $F_{(1,22)}$ : 10,08;  $P<0,01$ ). No se observaron diferencias en los niveles de POMC entre machos y hembras control, sin embargo, las hembras estresadas tenían disminuidos dichos niveles respecto a los machos estresados. Además, se observó un aumento de los niveles de ARNm de POMC en los machos estresados y una disminución en las hembras estresadas (Figura 12C).

Los niveles de ARNm del péptido anorexigénico CART se encontraban afectados por el sexo ( $F_{(1,22)}$ : 4,70;  $P<0,05$ ), pero no por el estrés prenatal, sin existir interacción entre ambos factores. Los niveles de CART eran mayores en las hembras control que en los machos control, sin existir diferencias entre machos y hembras estresados. Además, se observó que las hembras estresadas tenían menos expresión de CART que las hembras control, mientras que en los machos no se observaron diferencias (Figura 12D).



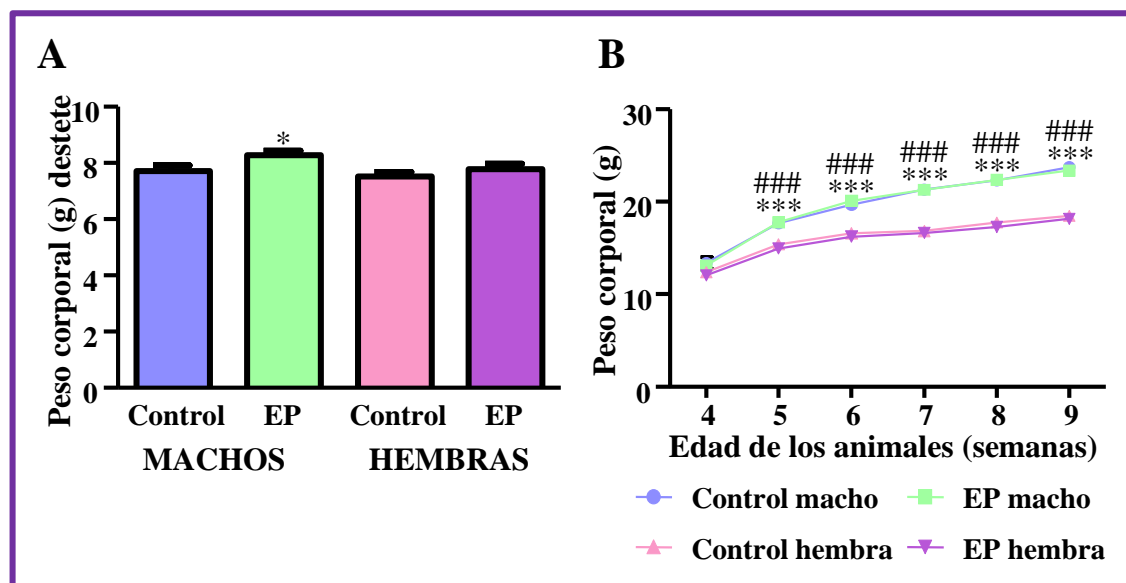
**Figura 12:** Niveles relativos de ARNm de NPY (A), AgRP (B), POMC (C) y CART (D) en el hipotálamo de ratones control y ratones estresados prenatalmente (EP), machos y hembras a día embrionario 17. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  e.e.m normalizados respecto a los valores de los machos control. **ANOVA:** AgrP ( $P<0,01$ ); POMC ( $P<0,01$ ); CART ( $P<0,05$ ); **t-Student:** NPY CT vs EP machos ( $P<0,05$ ); AgRP CT vs CT ( $P<0,01$ ); POMC CT vs EP hembras ( $P<0,01$ ); \* estadísticamente significativo respecto a grupo control del mismo sexo;  $\Delta$  estadísticamente significativo respecto al mismo grupo del sexo contrario.  $n=6-9$ /grupo.

## **1.2. EFECTO DEL ESTRÉS PRENATAL EN LA RESPUESTA METABÓLICA A UNA DIETA RICA EN SACAROSA INTRODUCIDA EN LA ETAPA ADULTA EN RATONES MACHO Y HEMBRA**

### **1.2.1. Efecto del estrés prenatal sobre el peso corporal de los animales durante las nueve semanas anteriores al cambio de dieta.**

Para conocer el efecto del estrés prenatal sobre el peso corporal de las crías se pesó a los animales el día del destete y semanalmente hasta la semana 9 que se instauró una dieta enriquecida en sacarosa.

Se observó un efecto del estrés prenatal ( $F_{(1,96)}: 5,15; P<0,05$ ), pero no del sexo, ni tampoco una interacción entre ambos factores sobre el peso corporal (g) de los animales en el momento del destete (día 21). Al analizar el efecto del estrés prenatal en cada uno de los sexos se observó que el peso corporal de los machos estresados en el día del destete era 0,6 g mayor que el de los machos control ( $P<0,05$ ), sin existir diferencias entre las hembras (Figura 13A). Sin embargo, esta diferencia de peso se pierde a las 4 semanas de edad (machos control:  $13,4 \pm 0,6$  g; EP:  $13,1 \pm 0,4$  g; hembras control:  $12,4 \pm 0,6$  g; EP:  $12,0 \pm 0,4$  g) y se mantiene de forma invariable hasta la semana 9, semana en la que se inició la dieta enriquecida en sacarosa; machos (control:  $23,7 \pm 0,5$  g; EP:  $23,4 \pm 0,5$  g) y hembras (control:  $18,5 \pm 0,3$  g; EP:  $18,1 \pm 0,4$  g). En este periodo de tiempo lo que sí se observó fue un efecto del sexo ( $F_{(1,15)}: 129,78; P<0,001$ ), siendo éste mayor en los machos que en las hembras, independientemente del grupo al que pertenezcan y del tiempo ( $F_{(5,75)}: 208,30; P<0,001$ ), existiendo una interacción entre el sexo y el tiempo ( $F_{(5,75)}: 13,97; P<0,001$ ). Tanto machos como hembras ganan peso progresivamente a lo largo de las semanas y la diferencia de peso entre ambos sexos es cada vez mayor (Figura 13B).

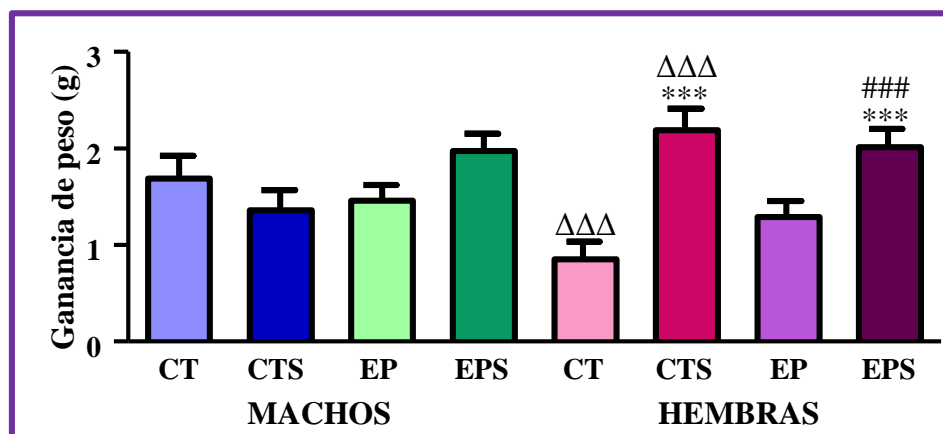


**Figura 13:** Peso corporal (g) en el destete (A) y desde la semana 4 hasta la semana 9 de vida (B) de ratones macho y hembra procedentes de madres control y madres estresadas durante la gestación. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  e.e.m. **ANOVA (peso destete):**  $P < 0,05$ ; \* estadísticamente significativo respecto a grupo control del mismo sexo; **ANOVA medidas repetidas (peso corporal):**  $P < 0,001$ ; \* control macho vs control hembra; # EP macho vs EP hembra.  $n=21-30$ /grupo peso destete;  $n=16$ /grupo peso corporal semana 4-9.

### 1.2.2. Efecto del estrés prenatal y de la ingesta de sacarosa durante 2 semanas en la etapa adulta sobre el peso corporal y la ganancia de peso en machos y hembras.

Se pesó a los ratones el primer día de dieta y se distribuyeron de forma homogénea entre los distintos grupos (controles y estresados) y que iban a beber una solución de sacarosa o los que iban a ingerir agua.

Al analizar la ganancia de peso (g) en los 17 días de dieta enriquecida con sacarosa se observó únicamente efecto de la ingesta de sacarosa ( $F_{(1,55)}: 16,58$ ;  $P < 0,001$ ) y una interacción entre el sexo y la ingesta de sacarosa ( $F_{(1,55)}: 11,59$ ;  $P < 0,001$ ) y entre el sexo, la ingesta de sacarosa y el estrés prenatal ( $F_{(1,55)}: 6,87$ ;  $P < 0,05$ ). Las hembras CT ganaron una media de 0,8 g menos de peso que los machos CT y, sin embargo, las hembras CTS ganaron una media de 0,8 g más de peso que los machos CTS. En los machos, no hubo diferencias significativas en la ganancia de peso entre los distintos grupos, sin embargo, las hembras CTS y EPS ganaron más peso durante este periodo que las hembras que ingirieron agua (CT y EP) (Figura 14).



**Figura 14:** Ganancia de peso (g) durante las dos semanas de dieta rica en sacarosa de ratones macho y hembra procedentes de madres control y madres estresadas durante la gestación y alimentados durante las dos semanas anteriores al sacrificio con pienso y agua o con pienso y una solución de sacarosa al 33%. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  e.e.m. **ANOVA:**  $P < 0,0001$ ; \* estadísticamente significativo respecto grupo CT del mismo sexo; # estadísticamente significativo respecto grupo EP del mismo sexo;  $\Delta$  estadísticamente significativo respecto al mismo grupo del sexo contrario.  $n=7-8$ /grupo.

### 1.2.3. Efecto del estrés prenatal y de la ingesta de sacarosa durante 2 semanas en la etapa adulta sobre la ingesta.

Se pesó la cantidad de comida sólida y se midió la cantidad de líquido ingerido por los animales durante las dos semanas de dieta.

#### 1.2.3.1. Ingesta sólida.

La cantidad media diaria de comida ingerida por ratón durante las dos semanas que duró el cambio de dieta se vio afectada por el sexo ( $F_{(1,24)}: 10,65$ ;  $P < 0,01$ ) y por el consumo de sacarosa ( $F_{(1,24)}: 292,89$ ;  $P < 0,001$ ), existiendo una interacción entre el sexo y la sacarosa ( $F_{(1,24)}: 4,92$ ;  $P < 0,05$ ). Las hembras CT y EP ingirieron menor cantidad de pienso que los machos CT y EP, sin diferencias entre el resto de grupos. Los ratones EP, tanto machos como hembras, ingirieron la misma cantidad de pienso que los ratones CT. Los ratones que bebieron sacarosa comían menor cantidad de alimento sólido que los ratones que bebieron agua (CT y EP), independientemente del sexo y del estrés prenatal (Figura 15A).

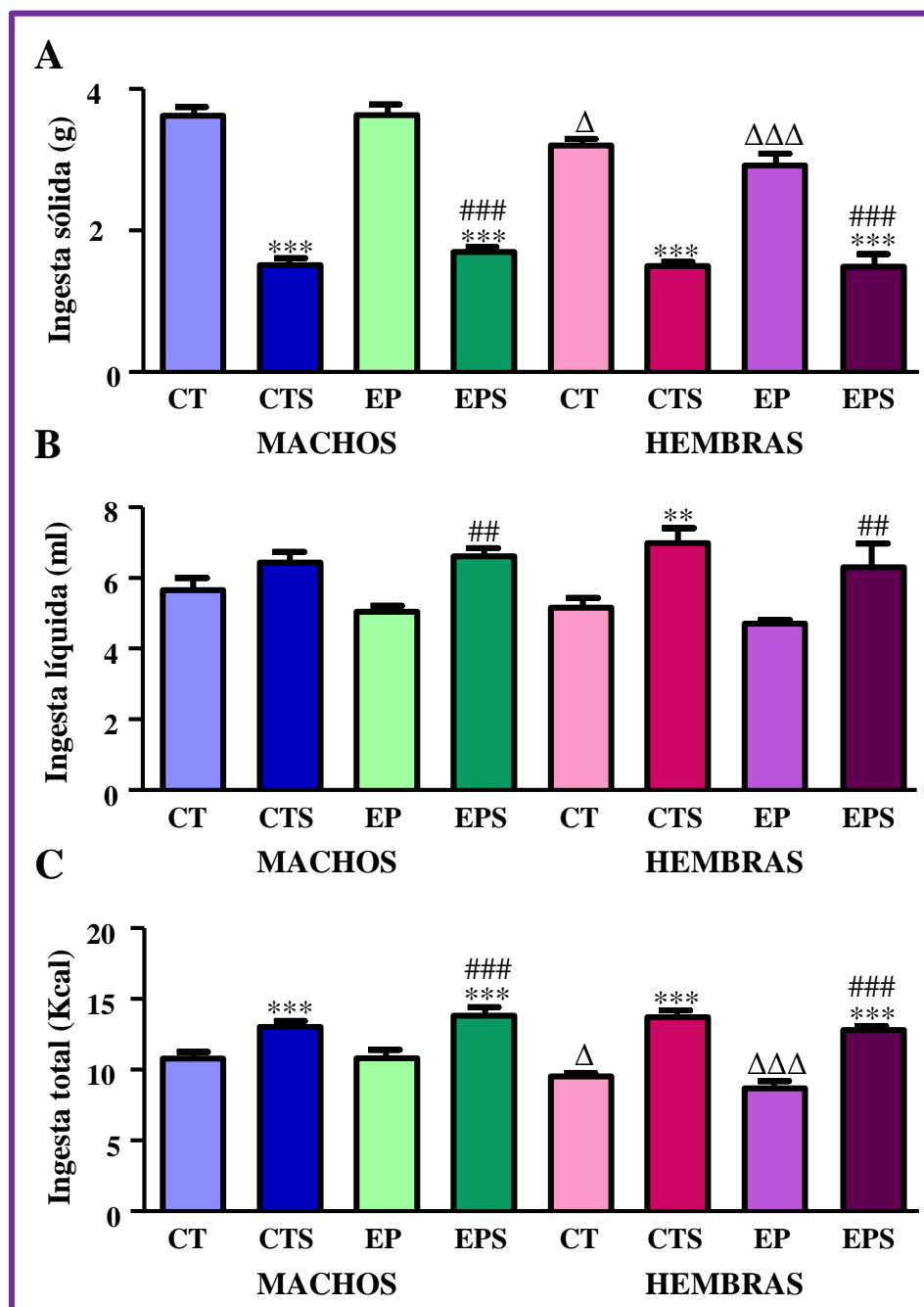
#### 1.2.3.2. Ingesta líquida.

Se observó un efecto de la ingesta de sacarosa ( $F_{(1,24)}: 33,76$ ;  $P < 0,001$ ), pero no del estrés, ni del sexo sobre la cantidad de líquido diario consumido por cada uno de los ratones durante las 2 semanas que duró el cambio de dieta, sin existir interacción entre ninguno de los factores en estudio. Los ratones que bebieron sacarosa (CTS y EPS) durante

2 semanas bebieron mayor cantidad de líquido diario que sus controles (CT y EP, respectivamente), aunque en el caso de los machos CTS este efecto no llegó a ser significativo (Figura 15B).

### **1.2.3.3. Ingesta kilocalórica total.**

La ingesta kilocalórica total diaria, proveniente de las kilocalorías aportadas por el pienso más las kilocalorías aportadas por la sacarosa, consumida por ratón durante las dos semanas del cambio de dieta se vio afectada por el sexo ( $F_{(1,24)}: 7,91; P<0,01$ ) y por la ingesta de sacarosa ( $F_{(1,24)}: 104,52; P<0,001$ ), existiendo una interacción entre el sexo y la ingesta de sacarosa ( $F_{(1,24)}: 5,49; P<0,05$ ). Las hembras CT y EP ingirieron menor cantidad de kcal totales que los machos CT y EP, sin diferencias entre el resto de grupos. Los ratones que bebieron sacarosa ingirieron mayor cantidad de kilocalorías totales que los ratones que bebieron agua, independientemente del sexo y del estrés prenatal (Figura 15C).



**Figura 15:** Ingesta media (g) diaria/ratón de comida sólida (A), cantidad (ml) media diaria/ratón de líquido ingerido (B) y cantidad total de comida (Kcal; pienso + bebida) diaria /ratón consumida (C) durante las dos semanas de dieta rica en sacarosa en ratones macho y hembra procedentes de madres control y madres estresadas durante la gestación y alimentados durante las dos semanas anteriores al sacrificio con pienso y agua o con pienso y una solución de sacarosa al 33%. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  e.e.m. **ANOVA:** ingesta sólida ( $P<0,0001$ ); ingesta líquida ( $P<0,01$ ); ingesta total ( $P<0,0001$ ); **t-Student** (CT machos-CT hembras): ingesta sólida ( $P<0,05$ ); ingesta total ( $P<0,05$ ); \* estadísticamente significativo respecto grupo CT del mismo sexo; # estadísticamente significativo respecto grupo EP del mismo sexo;  $\Delta$  estadísticamente significativo respecto al mismo grupo del sexo contrario.  $n=4$ /grupo.

### **1.2.4. Efecto del estrés prenatal y de la ingesta de sacarosa durante 2 semanas en la etapa adulta sobre los depósitos de tejido adiposo en machos y hembras.**

En el momento del sacrificio se pesaron los depósitos de tejido adiposo subcutáneo, visceral (perigonadal) y marrón.

#### **1.2.4.1. Tejido adiposo subcutáneo.**

Se observó un efecto del sexo ( $F_{(1,54)}: 13,92; P<0,001$ ) y de la ingesta de sacarosa ( $F_{(1,54)}: 13,60; P<0,01$ ), sin existir efecto del estrés prenatal, ni interacción entre ninguno de los factores estudiados. Las hembras CT y EPS tenían mayor cantidad de tejido adiposo subcutáneo que los machos CT y EPS, respectivamente. Los machos CTS tenían mayor cantidad de tejido adiposo subcutáneo que los CT, sin diferencias entre los machos EP. En las hembras se observó que las EPS tenían mayor cantidad de tejido adiposo subcutáneo que las hembras CT y EP (Figura 16A).

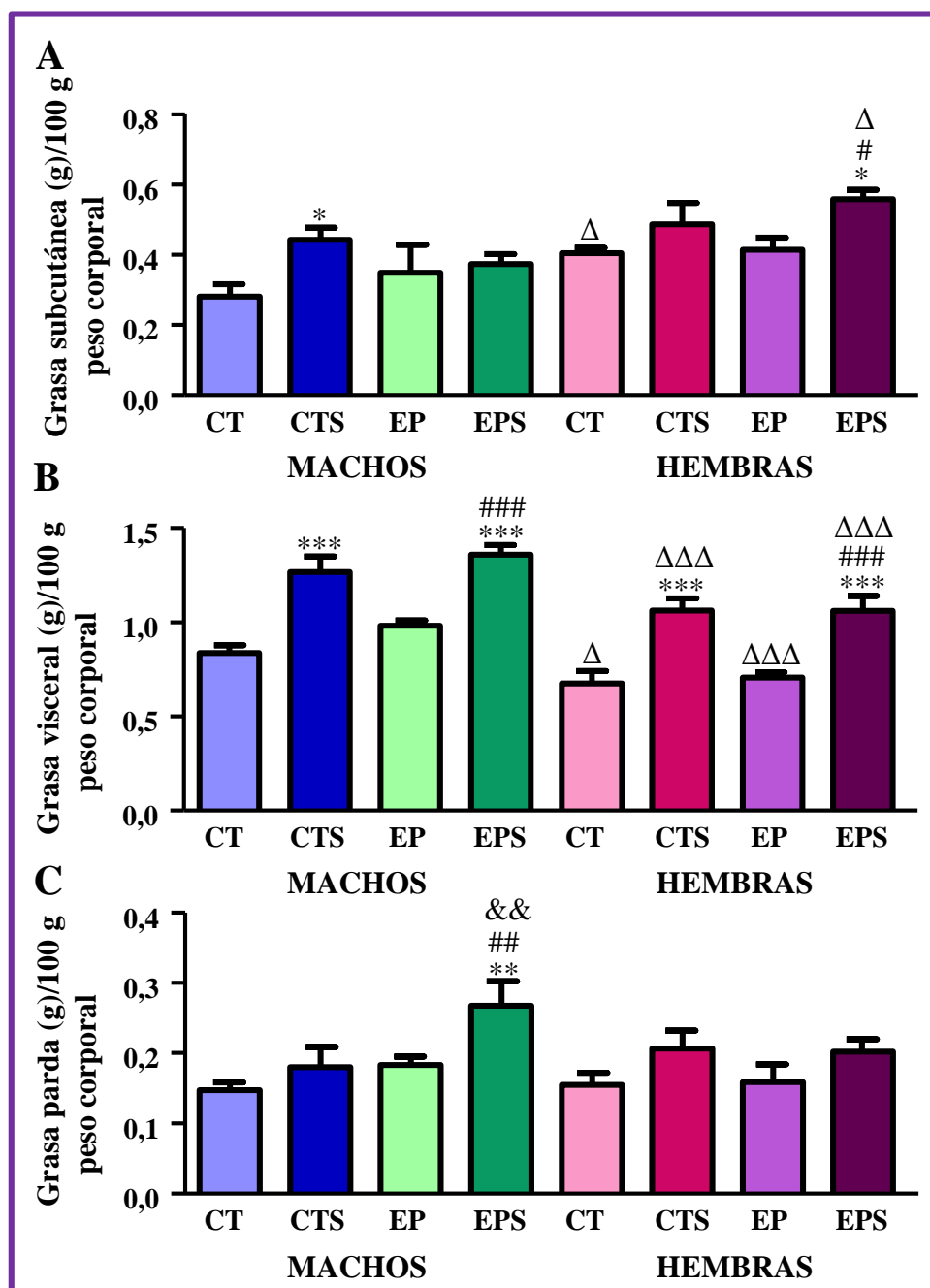
#### **1.2.4.2. Tejido adiposo visceral.**

El peso del tejido adiposo visceral estaba afectado por el sexo ( $F_{(1,53)}: 33,62; P<0,001$ ) y por la ingesta de sacarosa ( $F_{(1,53)}: 91,37; P<0,001$ ), sin existir efecto del estrés prenatal, ni interacción entre ninguno de los factores estudiados. Todas las hembras tenían menor cantidad de tejido adiposo visceral que los machos. Todos los ratones que ingirieron sacarosa, tanto machos como hembras, tenían mayor cantidad de tejido adiposo visceral que los ratones que ingirieron agua, independientemente de si habían sido estresados prenatalmente o no (Figura 16B).

#### **1.2.4.3. Tejido adiposo marrón.**

Se observó un efecto de la ingesta de sacarosa ( $F_{(1,49)}: 11,83; P<0,01$ ) y del estrés prenatal ( $F_{(1,49)}: 3,97; P<0,05$ ), pero no del sexo sobre la cantidad de tejido adiposo marrón, existiendo una interacción entre el sexo y el estrés ( $F_{(1,49)}: 4,00; P<0,05$ ). Los ratones macho EPS tenían más cantidad de tejido adiposo marrón que el resto de los grupos en estudio. En las hembras no se observaron diferencias significativas en la cantidad de tejido adiposo marrón (Figura 16C).





**Figura 16:** Peso (g) de la grasa subcutánea (A), visceral (B) y marrón (C) por 100 gramos de peso corporal en ratones macho y hembra procedentes de madres control y madres estresadas durante la gestación y alimentados durante las dos semanas anteriores al sacrificio con pienso y agua o con pienso y una solución de sacarosa al 33%. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  e.e.m. **ANOVA:** subcutánea ( $P < 0,05$ ); visceral ( $P < 0,0001$ ); parda ( $P < 0,01$ ); **t-Student** (CT machos-CT hembras): subcutánea ( $P < 0,05$ ); visceral ( $P < 0,05$ ); \* estadísticamente significativo respecto grupo CT del mismo sexo; # estadísticamente significativo respecto grupo EP del mismo sexo; & estadísticamente significativo respecto grupo CTS del mismo sexo; Δ estadísticamente significativo respecto al mismo grupo del sexo contrario.  $n=6-8/\text{grupo}$ .

### **1.2.5. Efecto del estrés prenatal y de la ingesta de sacarosa durante 2 semanas en la etapa adulta sobre los niveles séricos de hormonas metabólicas.**

#### **1.2.5.1. Glucosa.**

Los niveles de glucosa al sacrificio no estaban afectados ni por el sexo, ni por el estrés prenatal, ni por la ingesta de sacarosa. No se observaron diferencias significativas entre ninguno de los grupos en estudio; machos (CT:  $128,9 \pm 4,0$ ; CTS:  $125,9 \pm 5,9$ ; EP:  $117,4 \pm 4,3$ ; EPS:  $125,8 \pm 2,5$ ) y hembras (CT:  $115,5 \pm 4,6$ ; CTS:  $122,8 \pm 7,8$ ; EP:  $121,0 \pm 3,3$ ; EPS:  $120,3 \pm 5,4$ ).

#### **1.2.5.2. Leptina.**

Los niveles de leptina en suero estaban afectados por el sexo ( $F_{(1,45)}: 27,73$ ;  $P<0,001$ ) y por la ingesta de sacarosa ( $F_{(1,45)}: 13,57$ ;  $P<0,01$ ), pero no por el estrés prenatal, existiendo una interacción entre el sexo y el estrés ( $F_{(1,45)}: 6,20$ ;  $P<0,05$ ). Los niveles de leptina circulantes eran menores en las hembras estresadas (EP y EPS) que en los machos estresados, EP y EPS respectivamente. Este mismo efecto se observó en las hembras CT respecto a los machos CT. Los niveles de leptina circulantes estaban incrementados en los machos EPS respecto al resto de los grupos, no observándose diferencias entre el resto de grupos. En las hembras no se observaron diferencias significativas en ninguno de los grupos, aunque en las que bebieron sacarosa (CTS y EPS) existía una tendencia a tener mayores niveles de leptina (Figura 17A).

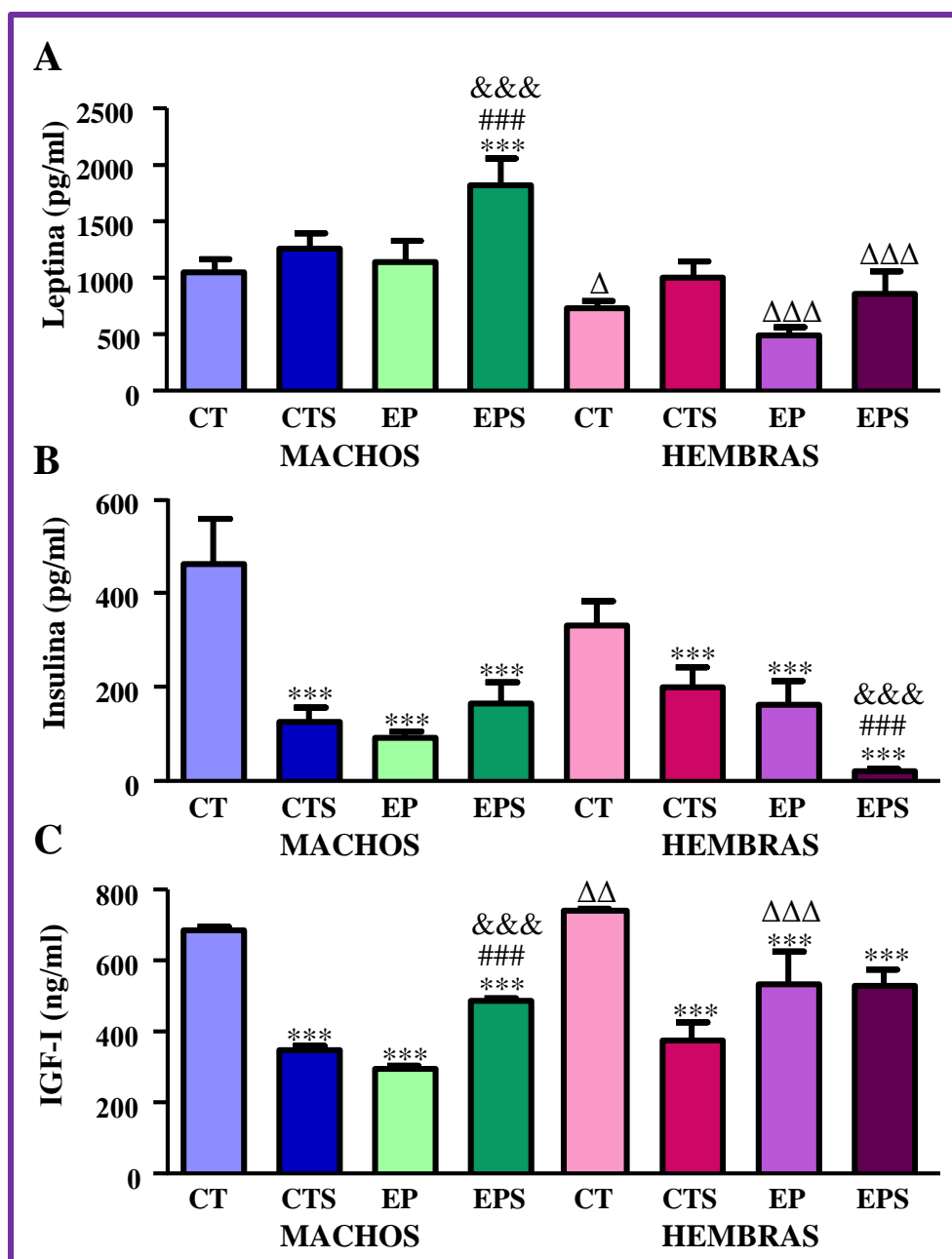
#### **1.2.5.3. Insulina.**

Se observó un efecto del estrés prenatal ( $F_{(1,26)}: 20,85$ ;  $P<0,001$ ) y de la ingesta de sacarosa ( $F_{(1,26)}: 13,00$ ;  $P<0,01$ ) en los niveles de insulina circulantes, existiendo una interacción entre el estrés prenatal y la sacarosa ( $F_{(1,26)}: 7,20$ ;  $P<0,05$ ) y entre el sexo, el estrés y la sacarosa ( $F_{(1,26)}: 8,00$ ;  $P<0,01$ ). Los ratones EP, tanto machos como hembras y los que bebieron sacarosa (CTS y EPS) tenían menores niveles de insulina que los ratones del grupo CT, sin diferencias entre los grupos EP y EPS en el caso de los machos y siendo esta disminución más acusada en el caso de las hembras (Figura 17B).

#### **1.2.5.4. IGF-I.**

Los niveles de IGF-I circulantes estaban afectados por el sexo ( $F_{(1,26)}: 9,68$ ;  $P<0,01$ ), la ingesta de sacarosa ( $F_{(1,26)}: 19,60$ ;  $P<0,001$ ) y el estrés prenatal ( $F_{(1,26)}: 6,81$ ;  $P<0,05$ ), existiendo una interacción entre el estrés prenatal y la sacarosa ( $F_{(1,26)}: 58,23$ ;  $P<0,001$ ). Las hembras CT y EP tenían mayores niveles de IGF-I que los machos CT y

EP, respectivamente. Los ratones macho EP tenían disminuidos los niveles de IGF-I respecto al grupo CT. La ingesta de sacarosa tuvo un efecto diferencial entre los grupos de animales control y estresados prenatalmente, ya que disminuyó dichos niveles en machos CT y los aumentó en los machos EP, siendo los niveles de IGF-I de los machos EPS menores que los de los machos CT. Las hembras EP y EPS tenían menores niveles de IGF-I que las hembras CT. La ingesta de sacarosa de nuevo tuvo un efecto diferencial, ya que, disminuyó los niveles de IGF-I en las hembras CTS y no los modificó en las EPS respecto a las EP (Figura 17C).

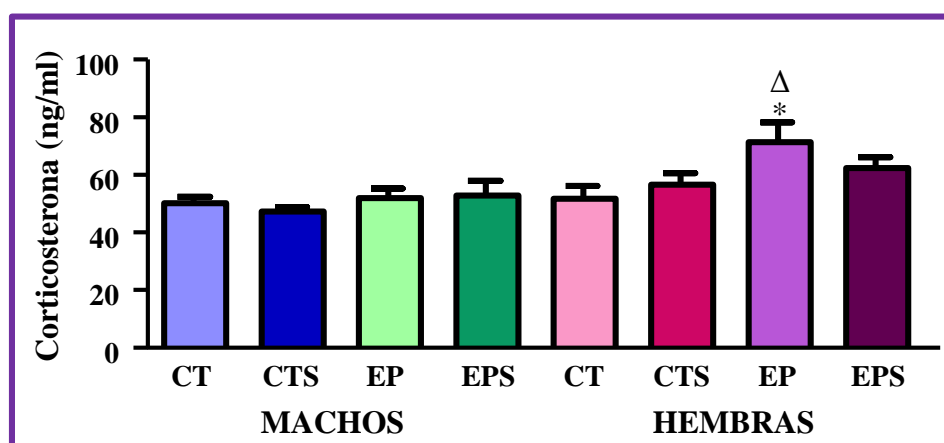


**Figura 17:** Niveles de leptina (A), insulina (B) e IGF-I (C) en el suero de ratones macho y hembra procedentes de madres control y madres estresadas durante la gestación y alimentados durante las dos semanas anteriores al sacrificio con pienso y agua o con pienso y una solución de sacarosa al 33%. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  e.e.m. **ANOVA:** leptina ( $P<0,05$ ); insulina ( $P<0,0001$ ); IGF-I ( $P<0,0001$ ); **t-Student** (CT machos-CT hembras): leptina ( $P<0,05$ ); IGF-I ( $P<0,01$ ); \* estadísticamente significativo respecto grupo CT del mismo sexo; # estadísticamente significativo respecto grupo EP del mismo sexo; & estadísticamente significativo respecto grupo CTS del mismo sexo;  $\Delta$  estadísticamente significativo respecto al mismo grupo del sexo contrario.  $n=3-8$ /grupo.

### 1.2.6. Efecto del estrés prenatal y de la ingesta de sacarosa durante 2 semanas en la etapa adulta sobre los niveles séricos de hormonas implicadas en estrés.

Se estudiaron los niveles de corticosterona, hormona implicada en la regulación del eje hipocampo-hipotálamo-hipófiso-suprarrenal e indicadora de estrés, para ver el efecto del estrés prenatal y si la ingesta de sacarosa inducía estrés.

Los niveles de corticosterona se vieron afectados tanto por el sexo ( $F_{(1,44)}: 10,17; P<0,01$ ) como por el estrés prenatal ( $F_{(1,44)}: 6,95; P<0,05$ ), pero no por la ingesta de sacarosa, sin existir interacción entre ninguno de los factores. Las hembras EP tenían mayores niveles de corticosterona que los machos EP, no observándose diferencias entre los distintos grupos de machos en estudio. Las hembras EP tenían mayores niveles de corticosterona que las hembras CT, sin diferencias en los animales que bebieron sacarosa (Figura 18).



**Figura 18:** Niveles de corticosterona en el suero de ratones macho y hembra procedentes de madres control y madres estresadas durante la gestación y alimentados durante las dos semanas anteriores al sacrificio con pienso y agua o con pienso y una solución de sacarosa al 33%. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  e.e.m. ANOVA:  $P<0,05$ ; \* estadísticamente significativo respecto grupo CT del mismo sexo;  $\Delta$  estadísticamente significativo respecto al mismo grupo del sexo contrario.  $n=3-8$ /grupo.

### 1.2.7. Efecto del estrés prenatal y de la ingesta de sacarosa durante 2 semanas en la etapa adulta sobre los niveles séricos de colesterol, triglicéridos, proteínas y lípidos totales y glicerol.

#### 1.2.7.1. Niveles séricos de triglicéridos (TG).

Los niveles séricos de triglicéridos se vieron afectados por el sexo ( $F_{(1,51)}: 9,99; P<0,01$ ), pero no por el estrés prenatal, ni por la ingesta de sacarosa y no se observó una

interacción entre ninguno de los factores en estudio. Los niveles séricos de triglicéridos eran menores en las hembras CT que en los machos CT (t-Student;  $P<0,05$ ). Al analizar dichos niveles entre los distintos grupos no se observaron diferencias significativas en ninguno de los dos sexos (machos CT:  $182,3 \pm 15,9$  mg/dl; CTS:  $157,5 \pm 11,7$  mg/dl; EP:  $165,1 \pm 21,0$  mg/dl; EPS:  $158,8 \pm 8,7$  mg/dl; hembras CT:  $136,6 \pm 12,2$  mg/dl; CTS:  $129,0 \pm 8,6$  mg/dl; EP:  $132,2 \pm 17,1$  mg/dl; EPS:  $140,6 \pm 12,3$  mg/dl).

#### **1.2.7.2. Niveles séricos de colesterol total (C-T).**

Se observó un efecto del sexo ( $F_{(1,24)}$ : 18,08;  $P<0,001$ ), pero no del estrés prenatal, ni de la ingesta de sacarosa sobre los niveles séricos de colesterol total, sin existir interacción entre los diferentes factores. Los niveles séricos de colesterol total eran menores en las hembras CTS y EPS que en los machos CTS y EPS, respectivamente (t-Student;  $P<0,05$ ). En los machos no se observaron diferencias significativas entre los distintos grupos (CT:  $156,1 \pm 7,7$  mg/dl; CTS:  $153,0 \pm 4,7$  mg/dl; EP:  $148,2 \pm 16,1$  mg/dl; EPS:  $164,8 \pm 8,9$  mg/dl). En las hembras, el estrés prenatal disminuyó los niveles de colesterol total, sin existir diferencias entre los grupos que bebieron sacarosa (CTS y EPS) y el grupo CT (CT:  $139,8 \pm 7,2$  mg/dl; CTS:  $141,5 \pm 0,8$  mg/dl; EP:  $118,7 \pm 1,9$  mg/dl; EPS:  $133,6 \pm 5,1$  mg/dl).

#### **1.2.7.3. Niveles séricos de LDL-colesterol (LDL-c).**

Los niveles séricos de LDL-colesterol se vieron afectados por el sexo ( $F_{(1,48)}$ : 14,60;  $P<0,001$ ), pero no por el estrés prenatal, ni por la ingesta de sacarosa, existiendo una interacción entre el estrés y la ingesta de sacarosa ( $F_{(1,48)}$ : 11,71;  $P<0,01$ ). Los niveles séricos de LDL colesterol eran menores en las hembras CT y EPS que en los machos CT y EPS, respectivamente (t-Student;  $P<0,05$ ). Los niveles de LDL-colesterol en los machos EP eran menores que en los CT y la ingesta de sacarosa tuvo un efecto diferencial, ya que, no modificó dichos niveles en el grupo CTS y los incrementó en el EPS respecto al EP, no existiendo diferencias entre el grupo CT y EPS (CT:  $62,2 \pm 2,5$  mg/dl; CTS:  $59,2 \pm 6,8$  mg/dl; EP:  $53,5 \pm 2,5$  mg/dl; EPS:  $69,5 \pm 4,1$  mg/dl). En las hembras se observó una tendencia similar a la de los machos aunque no llegó a ser significativa (CT:  $53,4 \pm 2,8$  mg/dl; CTS:  $47,4 \pm 2,7$  mg/dl; EP:  $47,7 \pm 2,7$  mg/dl; EPS:  $57,2 \pm 2,0$  mg/dl).

#### **1.2.7.4. Niveles séricos de HDL-colesterol (HDL-c).**

Los niveles séricos de HDL-colesterol se vieron afectados por los tres factores en estudio, el sexo ( $F_{(1,47)}$ : 5,67;  $P<0,05$ ), el estrés prenatal ( $F_{(1,47)}$ : 12,51;  $P<0,01$ ) y la ingesta

de sacarosa ( $F_{(1,47)}: 3,88; P<0,05$ ), además de existir una interacción entre el estrés prenatal y la sacarosa ( $F_{(1,47)}: 8,37; P<0,01$ ). Los niveles de HDL-colesterol se encontraban disminuidos en los ratones EP, tanto en machos como en hembras. La ingesta de sacarosa no tuvo ningún efecto en el grupo de animales CT, sin embargo, los machos y las hembras EPS tenían incrementados los niveles de HDL con respecto al grupo EP, no siendo estos diferentes a los del grupo CT; machos (CT:  $140,1 \pm 15,9$  mg/dl; CTS:  $141,7 \pm 19,9$  mg/dl; EP:  $75,1 \pm 9,0$  mg/dl; EPS:  $134,9 \pm 17,8$  mg/dl) y hembras (CT:  $125,7 \pm 6,7$  mg/dl; CTS:  $106,5 \pm 7,9$  mg/dl; EP:  $67,7 \pm 9,0$  mg/dl; EPS:  $100,9 \pm 14,4$  mg/dl).

#### **1.2.7.5. Niveles séricos de proteínas totales.**

No se observó efecto de ninguno de los factores en estudio sobre los niveles de proteínas totales, ni interacción entre ellos, no observándose diferencias significativas entre los distintos grupos en estudio; machos (CT:  $5,4 \pm 0,2$  g/dl; CTS:  $5,1 \pm 0,1$  g/dl; EP:  $5,1 \pm 0,5$  g/dl; EPS:  $5,3 \pm 0,3$  g/dl) y hembras (CT:  $5,1 \pm 0,2$  g/dl; CTS:  $4,8 \pm 0,2$  g/dl; EP:  $5,2 \pm 0,5$  g/dl; EPS:  $5,0 \pm 0,2$  g/dl).

#### **1.2.7.6. Niveles séricos de glicerol.**

Los niveles séricos de glicerol se vieron afectados por el sexo ( $F_{(1,46)}= 11,39; P<0,01$ ) pero no por el estrés prenatal o la ingesta de sacarosa, sin existir interacción alguna entre dichos factores. Los niveles séricos de glicerol eran menores en las hembras CT y CTS que en los machos CT y CTS, respectivamente (t-Student;  $P<0,05$ ). No se observaron diferencias significativas entre los distintos grupos en estudio ni en machos (CT:  $0,15 \pm 0,02$  mg/ml; CTS:  $0,14 \pm 0,01$  mg/ml; EP:  $0,11 \pm 0,01$  mg/ml; EPS:  $0,16 \pm 0,03$  mg/ml), ni en hembras, aunque en las hembras que ingirieron sacarosa (CTS y EPS) existía una tendencia a tener mayores niveles de glicerol (CT:  $0,092 \pm 0,004$  mg/ml; CTS:  $0,110 \pm 0,005$  mg/ml; EP:  $0,090 \pm 0,006$  mg/ml; EPS:  $0,110 \pm 0,009$  mg/ml).

#### **1.2.7.7. Niveles séricos de lípidos totales.**

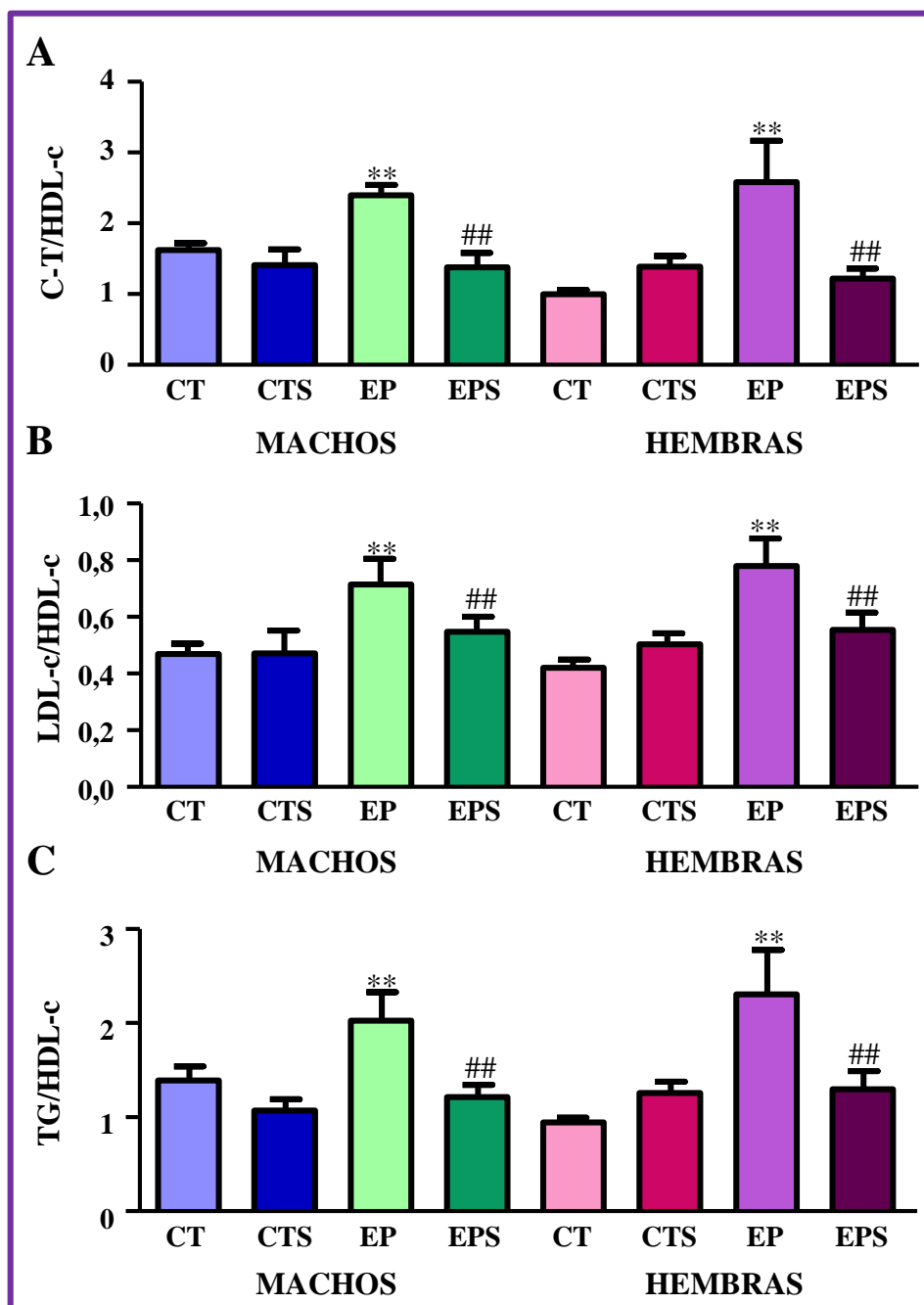
Los niveles séricos de lípidos totales fueron modificados por el sexo ( $F_{(1,49)}: 8,03; P<0,001$ ), pero no por el estrés prenatal, ni por la ingesta de sacarosa, existiendo una interacción entre el estrés y la ingesta de sacarosa ( $F_{(1,49)}: 11,20; P<0,01$ ). Los niveles séricos de lípidos totales eran menores en las hembras CT que en los machos CT (t-Student;  $P<0,01$ ). No se observaron diferencias significativas entre los distintos grupos en estudio, ni en machos (CT  $781,5 \pm 30,4$  mg/dl; CTS:  $682,8 \pm 17,6$  mg/dl; EP:  $695,3 \pm 40,0$

mg/dl; EPS:  $804,0 \pm 29,8$  mg/dl), ni en hembras (CT:  $668,5 \pm 16,8$  mg/dl; CTS:  $660,2 \pm 30,1$  mg/dl; EP:  $670,3 \pm 26,1$  mg/dl; EPS:  $730,7 \pm 33,2$  mg/dl).

### 1.2.7.8. Índices aterogénicos CT/HDL-c, LDL-c/HDL-c y cociente TG/HDL-c

El índice aterogénico CT/HDL-c y el coeficiente TG/HDL-c fueron modificados por el estrés prenatal (CT/HDL-c  $F_{(1,24)}$ : 6,60;  $P < 0,05$ ; TG/HDL-c  $F_{(1,47)}$ : 10,25;  $P < 0,01$ ) y por la ingesta de sacarosa (CT/HDL-c  $F_{(1,24)}$ : 6,92;  $P < 0,05$ ; TG/HDL-c  $F_{(1,47)}$ : 7,19;  $P < 0,01$ ), sin embargo, el índice LDL-c/HDL-c únicamente estaba modificado por el estrés prenatal ( $F_{(1,47)}$ : 15,39;  $P < 0,001$ ). En los tres parámetros existía una interacción entre el estrés prenatal y la ingesta de sacarosa (CT/HDL-c  $F_{(1,24)}$ : 9,21;  $P < 0,01$ ; LDL-c/HDL-c  $F_{(1,47)}$ : 6,54;  $P < 0,05$ ; TG/HDL-c  $F_{(1,47)}$ : 7,09;  $P < 0,01$ ). El estrés prenatal incrementó los niveles de CT/HDL, LDL-c/HDL-c y TG/HDL-c, tanto en machos como en hembras. La ingesta de sacarosa tuvo un efecto diferencial entre los grupos CTS y EPS en ambos sexos, ya que, no modificó los niveles de ninguno de los tres parámetros en los animales CTS y sin embargo, los disminuyó en el grupo EPS con respecto al grupo EP (Figura 19).





**Figura 19:** Niveles de los índices aterogénicos C-T/HDL-c (A) y LDL-c/HDL-c (B) y del cociente TG/HDL-c (C) de ratones macho y hembra procedentes de madres control y madres estresadas durante la gestación y alimentados durante las dos semanas anteriores al sacrificio con pienso y agua o con pienso y una solución de sacarosa al 33%. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  e.e.m. ANOVA: C-T/HDL-c ( $P < 0,01$ ); LDL-c/HDL-c ( $P < 0,01$ ); TG/HDL-c ( $P < 0,01$ ); \* estadísticamente significativo respecto grupo CT del mismo sexo; # estadísticamente significativo respecto grupo EP del mismo sexo.  $n = 3-8/\text{grupo}$ .

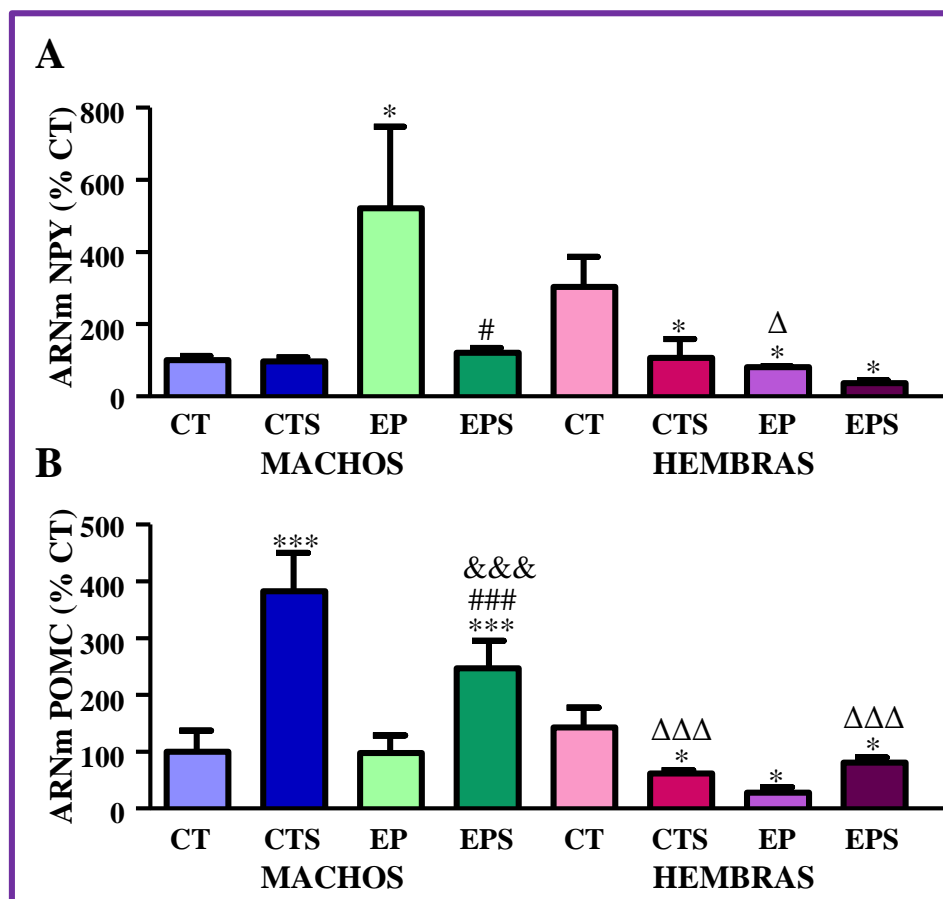
**1.2.8. Efecto del estrés prenatal y de la ingesta de sacarosa durante 2 semanas en la etapa adulta sobre los neuropéptidos hipotalámicos implicados en la regulación de la ingesta.**

**1.2.8.1. Niveles de ARNm de NPY.**

Se observó un efecto de la ingesta de sacarosa ( $F_{(1,16)}$ : 9,96;  $P<0,01$ ), pero no del sexo, ni del estrés prenatal sobre los niveles de NPY, existiendo una interacción entre el sexo y el estrés ( $F_{(1,16)}$ : 14,56;  $P<0,001$ ) y entre el sexo, el estrés y la ingesta de sacarosa ( $F_{(1,16)}$ : 8,25;  $P<0,01$ ). Los machos EP tenían mayores niveles de NPY que los machos CT. La ingesta de sacarosa tuvo un efecto diferencial, ya que no modificó los niveles de NPY en los machos CTS y los disminuyó en los EPS respecto al grupo de machos EP. Las hembras CTS y las EP, tanto si bebieron agua como sacarosa, tenían menores niveles de NPY que las hembras del grupo CT, sin diferencias entre los animales EP y EPS (Figura 20A).

**1.2.8.2. Niveles de ARNm de POMC.**

Los niveles hipotalámicos de POMC se vieron afectados por el sexo ( $F_{(1,16)}$ : 24,91;  $P<0,001$ ), por el estrés prenatal ( $F_{(1,16)}$ : 5,15;  $P<0,05$ ) y por la ingesta de sacarosa ( $F_{(1,16)}$ : 15,42;  $P<0,001$ ), existiendo una interacción entre el sexo y el consumo de sacarosa ( $F_{(1,16)}$ : 19,94;  $P<0,001$ ) y entre el sexo, el estrés prenatal y el consumo de sacarosa ( $F_{(1,16)}$ : 6,74;  $P<0,05$ ). Las hembras CTS y EPS tenían menores niveles de POMC que los machos CTS y EPS, respectivamente. Los niveles de POMC no se modificaron en los machos EP y los machos que bebieron sacarosa (CTS y EPS) tenían mayores niveles de POMC que los machos que bebieron agua, siendo este incremento más acusado en los ratones del grupo CTS. En las hembras, los niveles de POMC disminuyeron en las estresadas y en las que bebieron sacarosa, sin diferencias significativas entre ambos grupos de hembras estresadas (Figura 20B).

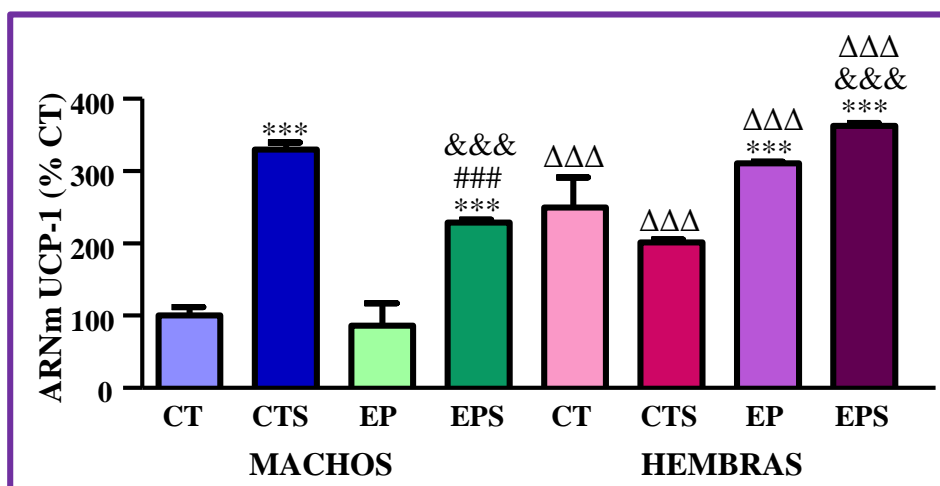


**Figura 20:** Niveles relativos de ARNm de NPY (A) y POMC (B) en el hipotálamo de ratones macho y hembra procedentes de madres control y madres estresadas durante la gestación y alimentados durante las dos semanas anteriores al sacrificio con pienso y agua o con pienso y una solución de sacarosa al 33%. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  e.e.m normalizados respecto a los valores de los machos control. **ANOVA:** NPY ( $P < 0,05$ ); POMC (machos y hembras juntos  $P < 0,001$ ; hembras  $P < 0,05$ ); \* estadísticamente significativo respecto grupo CT del mismo sexo; # estadísticamente significativo respecto grupo EP del mismo sexo; & estadísticamente significativo respecto grupo CTS del mismo sexo; Δ estadísticamente significativo respecto al mismo grupo del sexo contrario.  $n=3/\text{grupo}$ .

### 1.2.9. Efecto del estrés prenatal y de la ingesta de sacarosa durante 2 semanas en la etapa adulta sobre los niveles de ARNm de la proteína desacoplante UCP-1 implicada en el control del balance energético.

Se observó un efecto del sexo ( $F_{(1,16)}: 49,34; P < 0,001$ ) y de la ingesta de sacarosa ( $F_{(1,16)}: 48,44; P < 0,001$ ), pero no del estrés prenatal sobre los niveles de UCP-1 medidos en el tejido adiposo marrón, existiendo una interacción entre el sexo y el estrés ( $F_{(1,16)}: 38,49; P < 0,001$ ), entre el sexo y la sacarosa ( $F_{(1,16)}: 49,08; P < 0,001$ ) y entre el sexo, el estrés y la sacarosa ( $F_{(1,16)}: 11,99; P < 0,01$ ). Todas las hembras estresadas (EP y EPS) y las CT tenían mayores niveles de UCP-1 que los machos. Las hembras CTS, sin embargo,

tenían menores niveles de UCP-1 que los machos CTS. Los ratones macho que bebieron sacarosa (CTS y EPS) tenían mayores niveles de UCP-1 que los ratones que bebieron agua, siendo este incremento mayor en los ratones CTS. Las hembras estresadas (EP y EPS) tenían mayores niveles de UCP-1 que las hembras CT y CTS. La ingesta de sacarosa no tuvo ningún efecto ni en el grupo CT, ni en el EPS (Figura 21).



**Figura 21:** Niveles relativos de ARNm de UCP-1 en la grasa parda de ratones macho y hembra procedentes de madres control y madres estresadas durante la gestación y alimentados durante las dos semanas anteriores al sacrificio con pienso y agua o con pienso y una solución de sacarosa al 33%. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  e.e.m normalizados respecto a los valores de los animales control. **ANOVA:**  $P < 0,0001$ ; \* estadísticamente significativo respecto grupo CT del mismo sexo; # estadísticamente significativo respecto grupo EP del mismo sexo; & estadísticamente significativo respecto grupo CTS del mismo sexo; Δ estadísticamente significativo respecto al mismo grupo del sexo contrario.  $n=3/\text{grupo}$ .

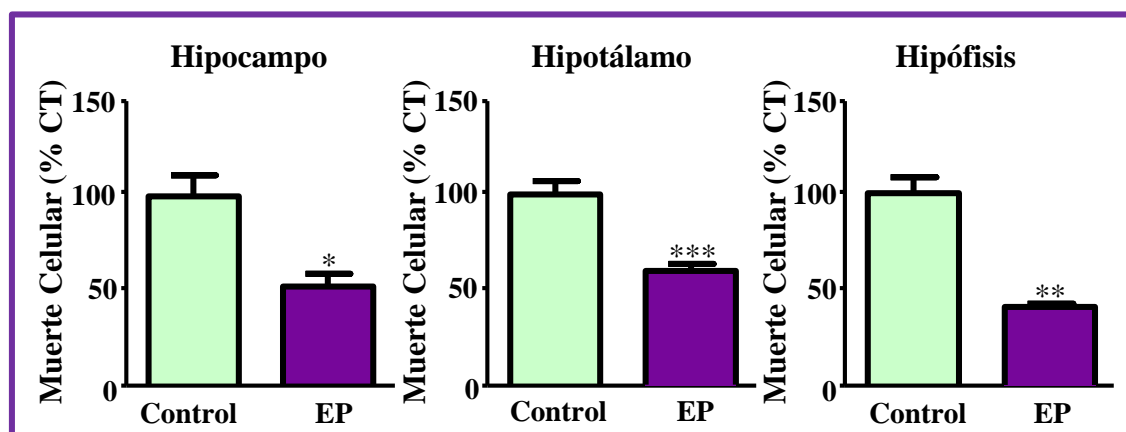
## 2. ESTUDIO DEL RECAMBIO CELULAR EN EL EJE HIPOCAMPO-HIPOTÁLAMO-HIPOFISARIO

En esta segunda parte del trabajo se quiso estudiar el efecto del estrés prenatal sobre el recambio celular, estudiando los niveles de muerte y proliferación celular y los mecanismos implicados en este efecto, así como, si el efecto del estrés prenatal podría condicionar la respuesta del recambio celular frente a otro estímulo posterior como la ingesta de sacarosa.

### 2.1. EFECTO DEL ESTRÉS PRENATAL EN EL RECAMBIO CELULAR EN EL EJE HIPOCAMPO-HIPOTÁLAMO-HIPOFISARIO EN RATAS MACHO ADULTAS

#### 2.1.1 Efecto del estrés prenatal sobre los niveles de muerte celular en el eje hipocampo-hipotálamo-hipofisario.

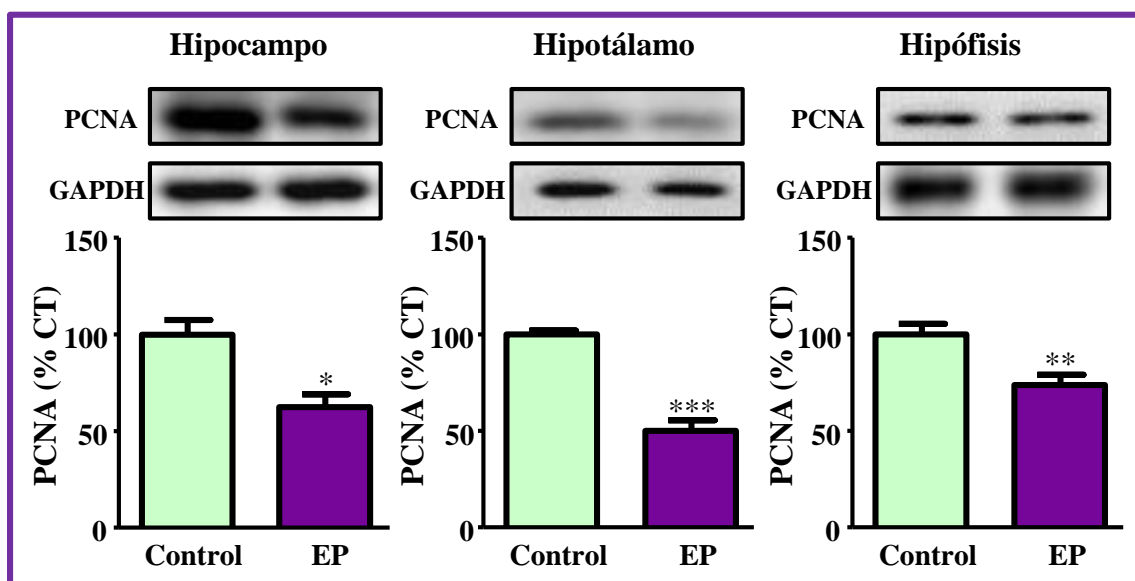
En primer lugar se estudió si el estrés prenatal afectaba a la muerte celular. Para cuantificar los niveles de muerte existentes en el hipocampo, el hipotálamo y la hipófisis se realizó un ELISA de detección de muerte celular, el cual detecta oligonucleosomas citoplasmáticos. Se observó una inhibición de la muerte celular programada en las tres áreas en estudio de las ratas estresadas (Figura 22).



**Figura 22:** Niveles relativos de muerte celular en hipocampo, hipotálamo e hipófisis de ratas macho control y ratas macho estresadas prenatalmente (EP). Los resultados se expresan como medias  $\pm$  e.e.m normalizados respecto a los valores de los animales control. **t-Student:** \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ .  $n = 3-4$ /grupo.

### 2.1.2. Efecto del estrés prenatal sobre la proliferación celular en el eje hipocampo-hipotálamo-hipofisario.

Una vez conocido el efecto que el estrés prenatal inducía sobre la muerte celular en el eje HHH se estudió si el estrés inducía cambios en la proliferación celular. Para ello, se midieron los niveles de PCNA (Antígeno Nuclear de Proliferación Celular) mediante “western blotting”, detectándose una disminución significativa en las ratas estresadas en las tres áreas en estudio (Figura 23).



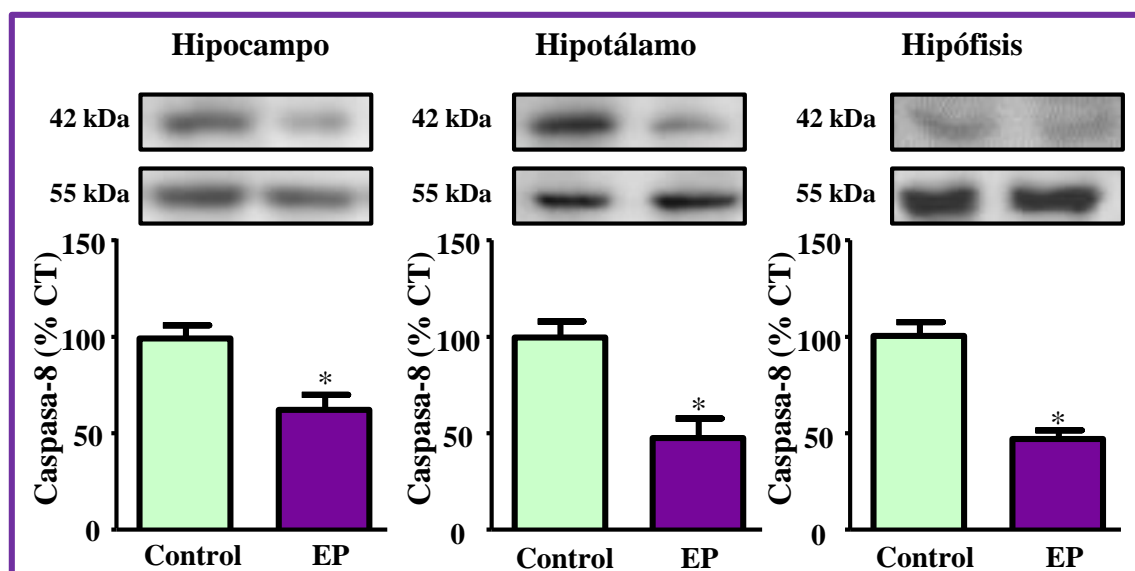
**Figura 23:** Niveles relativos de la proteína PCNA en el hipocampo, el hipotálamo y la hipófisis de ratas macho control y ratas macho estresadas prenatalmente. Los valores se expresan como medias  $\pm$  e.e.m normalizados respecto a los valores de los animales control. Se muestra un gel representativo de cada una de las áreas estudiadas. **t-Student:** \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ .  $n = 3-4$ /grupo.

### 2.1.3. Efecto del estrés prenatal sobre las vías de muerte celular en el eje Hipocampo-Hipotálamo-Hipofisario.

Puesto que se observó un efecto del estrés prenatal sobre los niveles de muerte celular, se procedió al estudio de las proteínas implicadas en las rutas apoptóticas dependientes de caspasas.

La caspasa iniciadora de la vía intrínseca o caspasa-9 no presentó cambios significativos en ninguna de las áreas estudiadas, hipocampo (Control:  $100,0 \pm 20,3$ ; EP:  $91,1 \pm 19,4$ ), hipotálamo (Control:  $100,0 \pm 6,0$ ; EP:  $102,0 \pm 10,7$ ) e hipófisis (Control:

100,0  $\pm$  29,2; EP: 87,1  $\pm$  23,0) mientras que la caspasa-8, caspasa iniciadora y/o efectora de la ruta extrínseca, se encuentra inhibida en el grupo de ratas sometidas a estrés en las tres áreas (Figura 24).

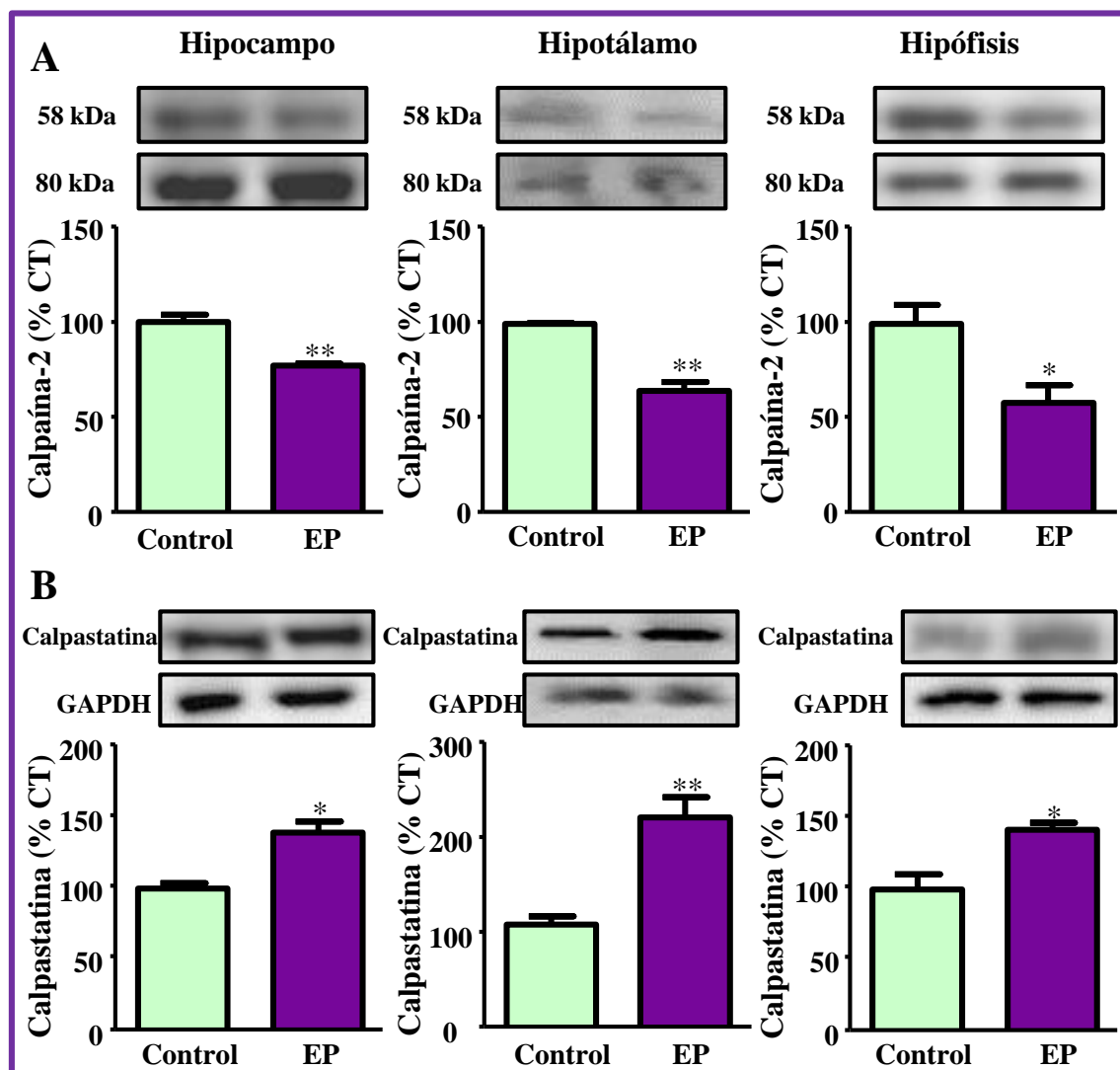


**Figura 24:** Niveles relativos de la proteína caspasa-8 fragmentada en el hipocampo, el hipotálamo y la hipófisis de ratas macho control y ratas macho estresadas prenatalmente. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  e.e.m normalizados respecto a los valores de los animales control. Se muestra un gel representativo de cada una de las áreas estudiadas. **t-Student:** \*  $P < 0,05$ .  $n = 3-4$ /grupo.

#### 2.1.4. Efecto del estrés prenatal sobre la vía de la calpaína en el eje Hipocampo-Hipotálamo-Hipofisario.

Otra de las rutas implicadas en muerte celular es la ruta de las calpaínas. Se observó una disminución de la calpaína-2 en los animales estresados en las tres áreas (Figura 25A).

En paralelo a estos resultados se analizaron los niveles de calpastatina, único inhibidor endógeno de las calpaínas, observándose un aumento de éste en los animales estresados en las tres áreas en estudio (Figura 25B).

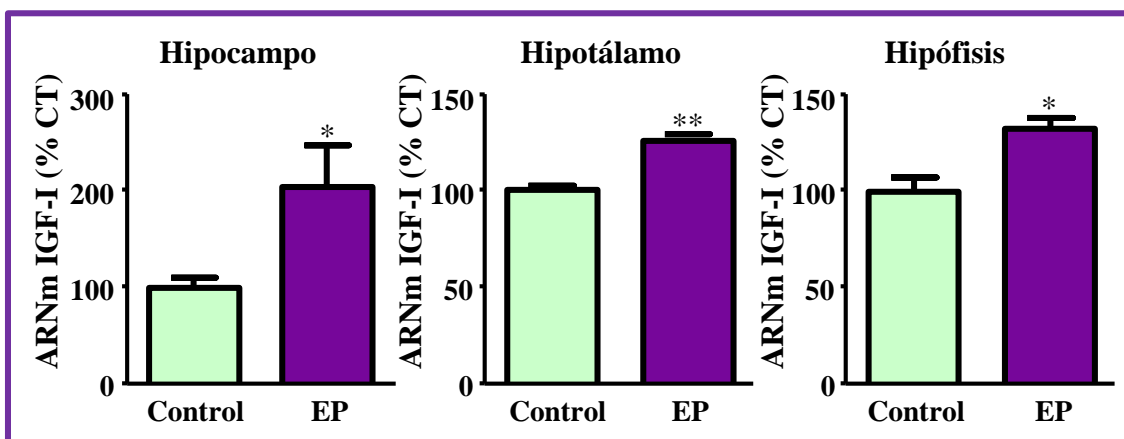


**Figura 25:** Niveles relativos de la proteína calpaína-2 fragmentada (A) y Calpastatina (B) en el hipocampo, el hipotálamo y la hipófisis de ratas macho control y ratas macho estresadas prenatalmente. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  e.e.m normalizados respecto a los valores de los animales control. Se muestra un gel representativo de cada una de las áreas estudiadas. **t-Student:** \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ .  $n = 3-4$ /grupo.

#### 2.1.5. Efecto del estrés prenatal sobre los niveles de IGF-I en el eje Hipocampo-Hipotálamo-Hipofisario y los niveles de IGF-I circulante.

Se estudiaron los niveles de ARNm de IGF-I y se encontró un incremento de dichos niveles en los animales estresados en las tres áreas (Figura 26). Además se midieron los niveles circulantes de IGF-I mediante ELISA, no observándose diferencias significativas entre los animales control y los animales estresados (Control:  $1257 \pm 14$  ng/ml; EP:  $1180 \pm 38$  ng/ml).





**Figura 26:** Niveles relativos de ARNm de IGF-I en el hipocampo, el hipotálamo y la hipófisis de ratas macho control y ratas macho estresadas prenatalmente. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  e.e.m normalizados respecto a los valores de los animales control. **t-Student:** \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ .  $n = 3-5$ /grupo.

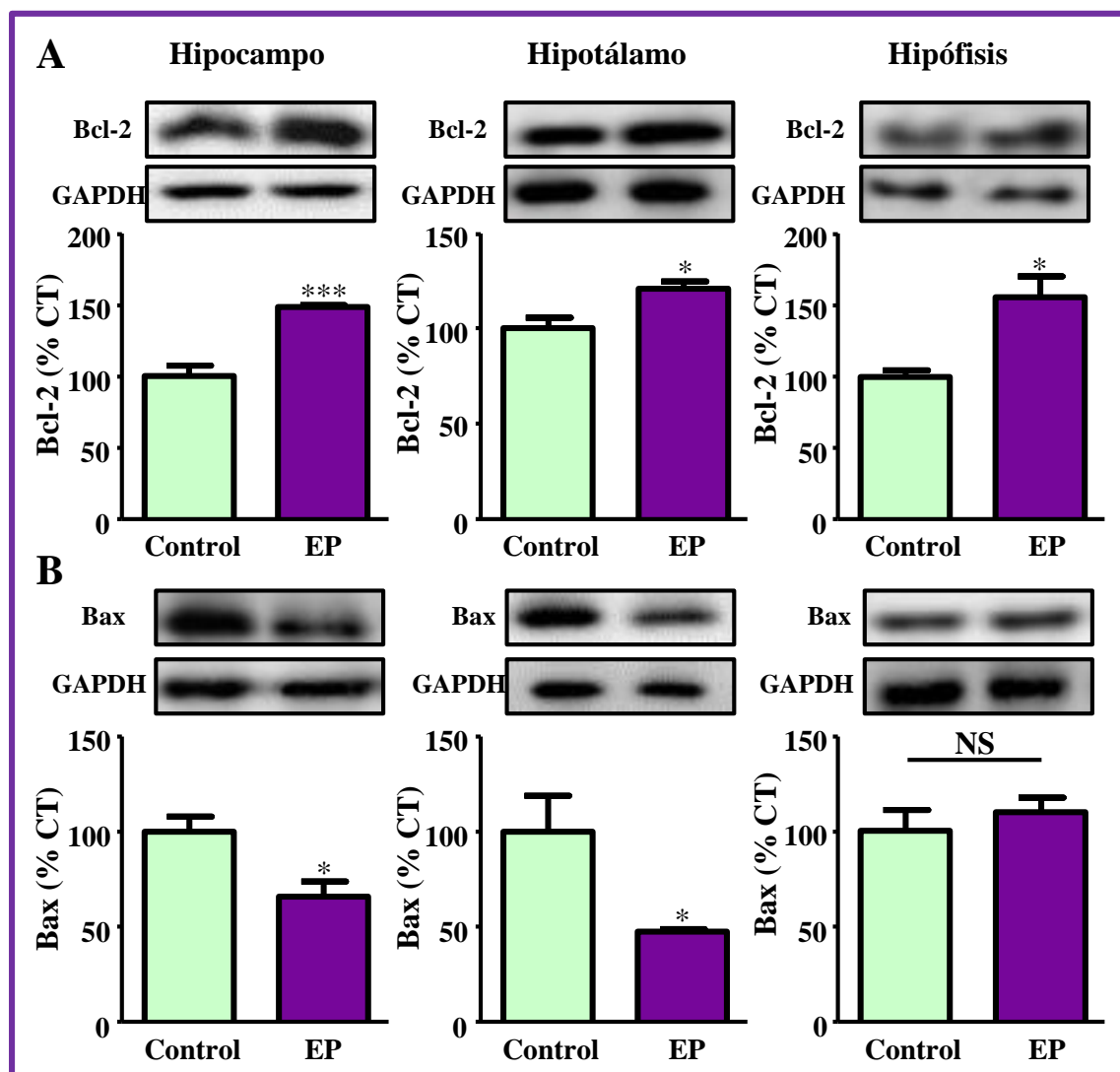
### 2.1.6. Efecto del estrés prenatal sobre proteínas reguladoras de la apoptosis en el eje Hipocampo-Hipotálamo-Hipofisario.

Se analizaron los niveles de varias proteínas y factores de transcripción implicados en la regulación del proceso de muerte celular, entre ellos Bcl-2 y Bax, proteínas pertenecientes a la familia de Bcl-2 y los factores de transcripción p53 y CREB.

#### 2.1.6.1. Niveles proteicos de Bcl-2 y Bax

Bcl-2 es una proteína mitocondrial anti-apoptótica. Los niveles de esta proteína se encontraban incrementados en los animales estresados en las tres áreas en estudio (Figura 27A).

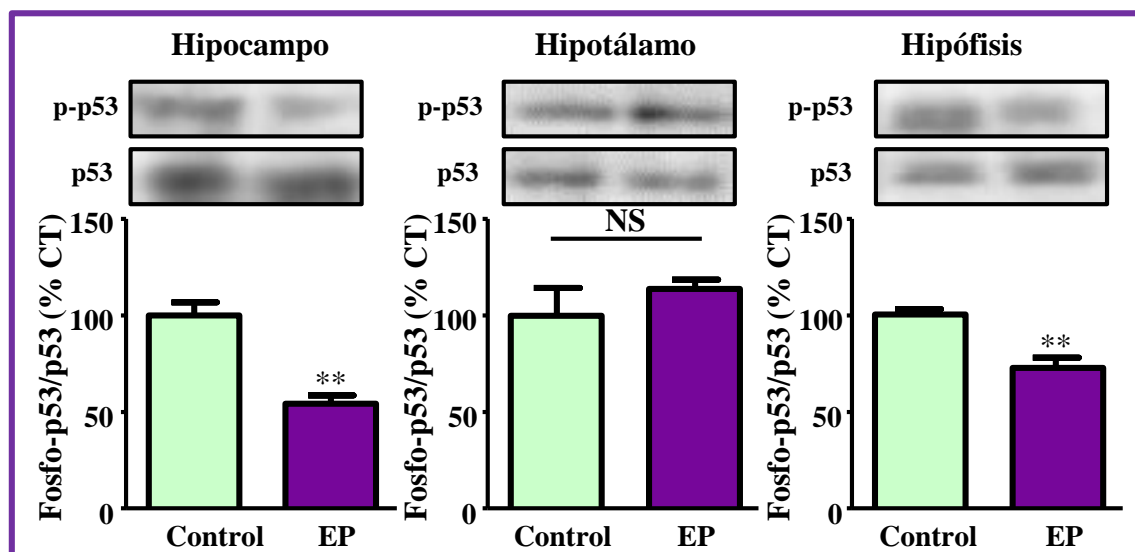
Con respecto a Bax (proteína pro-apoptótica), se observó una disminución significativa de estos niveles en el hipocampo y en el hipotálamo de los animales estresados, sin encontrar diferencias en la hipófisis (Figura 27B).



**Figura 27:** Niveles relativos de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 (**A**) y de la proteína pro-apoptótica Bax (**B**) en el hipocampo, el hipotálamo y la hipófisis de ratas macho control y ratas macho estresadas prenatalmente. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  e.e.m normalizados respecto a los valores de los animales control. Se muestra un gel representativo de cada una de las áreas estudiadas. **t-Student:** NS: no significativo; \*  $P < 0,05$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ .  $n = 3-4$ /grupo.

#### 2.1.6.2. Niveles proteicos de p53

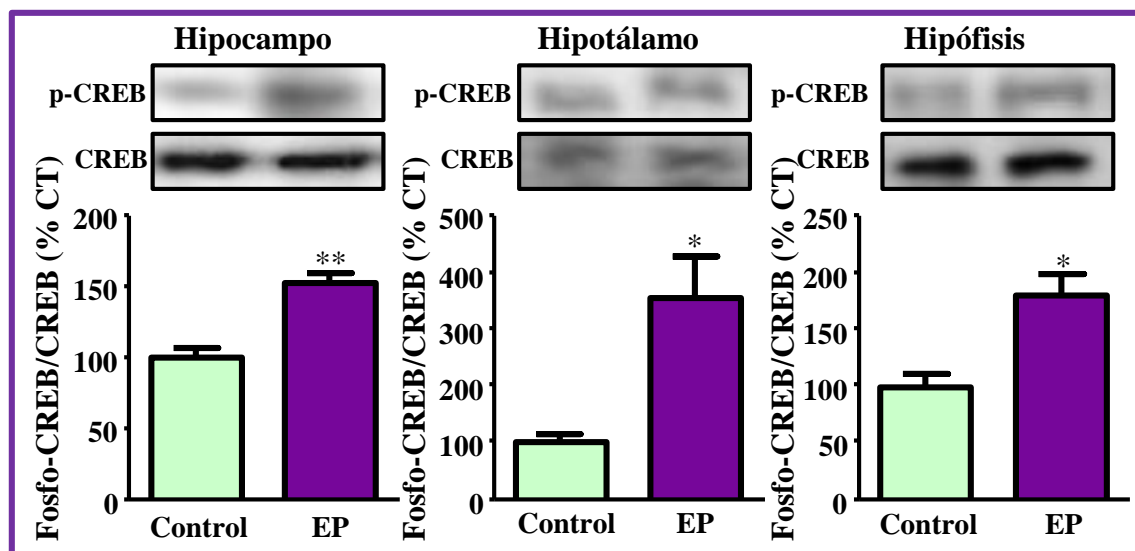
Los niveles de fosforilación de p53 (p-p53), proteína implicada en el control del ciclo celular y la inducción de apoptosis, se encontraban disminuidos en los animales estresados, tanto en el hipocampo como en la hipófisis, pero no estaban modificados en el hipotálamo (Figura 28).



**Figura 28:** Niveles relativos de la proteína p-p53 en el hipocampo, el hipotálamo y la hipófisis de ratas macho control y ratas macho estresadas prenatalmente. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  e.e.m normalizados respecto a los valores de los animales control. Se muestra un gel representativo de cada una de las áreas estudiadas. **t-Student:** NS: no significativo; \*\*  $P < 0,01$ .  $n = 3-4$ /grupo.

#### 2.1.6.3. Niveles proteicos de CREB

Los animales estresados tenían incrementados los niveles de p-CREB en las tres áreas estudiadas (Figura 29).



**Figura 29:** Niveles relativos de la proteína p-CREB en el hipocampo, el hipotálamo y la hipófisis de ratas macho control y ratas macho estresadas prenatalmente. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  e.e.m normalizados respecto a los valores de los animales control. Se muestra un gel representativo de cada una de las áreas estudiadas. **t-Student:** \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ .  $n = 3-4$ /grupo.

### 2.1.7. Niveles de ARNm de las hormonas hipofisarias.

Se analizaron mediante RT-PCR de los niveles de ARNm de las distintas hormonas, hormona del crecimiento (GH), prolactina (PRL), proopiomelanocortina (POMC) como precursor de la hormona adrenocorticotropa (ACTH), hormona luteinizante (LH), la hormona estimulante de la tiroides (TSH) y la hormona folículoestimulante (FSH), encontrándose todas ellas, excepto la hormona del crecimiento, incrementadas en los animales estresados (Tabla 3).

Hormona Hipofisaria	Control	EP
<b>GH</b>	100 ± 9,1	103 ± 14,6
<b>PRL</b>	100 ± 5,8	137 ± 6,1 *
<b>POMC</b>	100 ± 5,4	140 ± 12,0 *
<b>LH</b>	100 ± 9,6	128 ± 8,1 *
<b>TSH</b>	100 ± 4,4	131 ± 19,7
<b>FSH</b>	100 ± 0,2	118 ± 5,7 *

**Tabla 3:** Niveles relativos de ARNm de GH, PRL, POMC, LH, TSH y FSH en la hipófisis de ratas macho control y ratas macho estresadas prenatalmente. Los resultados se expresan como medias ± e.e.m normalizados respecto a los valores de los animales control. **t-Student:** \*  $P < 0,05$ . n=3/grupo.

### 2.1.8. Niveles proteicos de GFAP y Tuj-1 en el hipocampo y el hipotálamo.

Se analizaron los niveles de GFAP y Tuj-1, marcadores específicos de astrocitos y neuronas respectivamente mediante “western blotting” y no se observaron diferencias significativas entre los animales control y los animales estresados ni en el hipocampo, ni en el hipotálamo (Tabla 4).

	Hipocampo		Hipotálamo		
	Control	EP	Control	EP	
<b>GFAP</b>	100,0 ± 2,8	93,8 ± 7,5	100,0 ± 21,5	111,9 ± 26,5	NS
<b>Tuj-1</b>	100 ± 11,6	79,6 ± 14,0	100,0 ± 8,9	106,3 ± 5,9	NS

**Tabla 4:** Niveles relativos de la proteína GFAP y Tuj-1 en el hipocampo y el hipotálamo de ratas macho control y ratas macho estresadas prenatalmente. Los resultados se expresan como medias ± e.e.m normalizados respecto a los valores de los animales control. **t-Student:** NS: no significativo. n=3-4/grupo.

---

---

## **2.2. EFECTO DEL ESTRÉS PRENATAL EN EL RECAMBIO CELULAR EN EL HIPOCAMPO Y EL HIPOTÁLAMO DE EMBRIONES DE RATÓN DE 17 DÍAS**

### **2.2.1. HIPOCAMPO**

#### **2.2.1.1. Efecto del estrés prenatal sobre los niveles de muerte celular y proliferación en el hipocampo de embriones de ratón de 17 días, machos y hembras.**

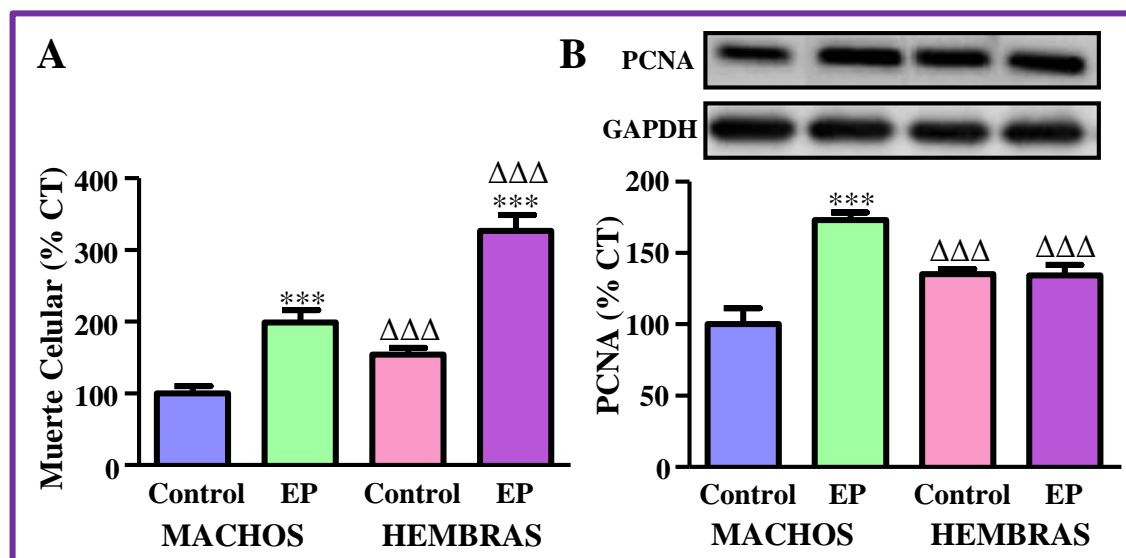
Para el estudio del efecto del estrés prenatal sobre el recambio celular en el hipocampo se midieron los niveles relativos de muerte celular mediante ELISA y los niveles de PCNA mediante “western blotting”.

##### **2.2.1.1.1. Muerte celular.**

Se observó un efecto del estrés prenatal ( $F_{(1,7)}$ : 87,20;  $P<0,0001$ ) y del sexo ( $F_{(1,7)}$ : 38,87;  $P<0,001$ ) sobre los niveles de muerte celular y una interacción entre ambos factores ( $F_{(1,7)}$ : 6,309;  $P<0,05$ ). Las hembras, tanto control como estresadas, tenían mayores niveles de muerte celular que los machos del mismo grupo. Además, los ratones estresados mostraron mayores niveles de muerte celular que los controles (Figura 30A).

##### **2.2.1.1.2. Niveles proteicos de PCNA.**

Se observó un efecto del estrés prenatal ( $F_{(1,8)}$ : 23,33;  $P<0,01$ ), pero no del sexo sobre los niveles de PCNA y una interacción entre ambos factores ( $F_{(1,8)}$ : 24,68;  $P<0,01$ ). Las hembras control tenían mayores niveles de PCNA que los machos control, y sin embargo, las hembras estresadas tenían dichos niveles disminuidos respecto a los machos estresados. Los niveles de PCNA estaban incrementados en los ratones macho estresados y no estaban modificados en las hembras (Figura 30B).



**Figura 30:** Niveles relativos de muerte celular (A) y de la proteína PCNA (B) en el hipocampo de ratones control y ratones estresados prenatalmente (EP), machos y hembras a día embrionario 17. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  e.e.m normalizados respecto a los valores de los machos control. Se muestra un gel representativo. **ANOVA:** Muerte ( $P < 0,001$ ); PCNA ( $P < 0,001$ ); \* estadísticamente significativo respecto grupo control del mismo sexo;  $\Delta$  estadísticamente significativo respecto mismo grupo del sexo contrario.  $n=3/\text{grupo}$ .

#### 2.2.1.2. Efecto del estrés prenatal sobre las vías de muerte celular en el hipocampo de embriones de ratón de 17 días, machos y hembras.

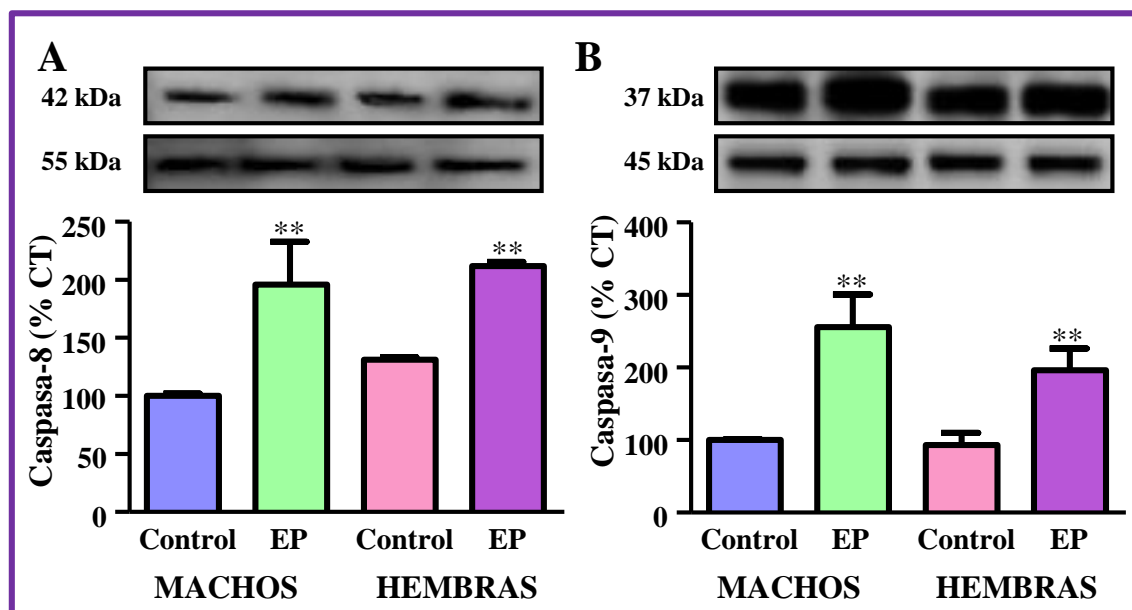
Una vez estudiado el efecto del estrés prenatal sobre los niveles de muerte celular, se procedió al estudio de las proteínas implicadas en las rutas apoptóticas dependientes de caspasas en el hipocampo.

##### 2.2.1.2.1. Niveles proteicos de caspasa-8.

Se observó un efecto del estrés prenatal sobre los niveles de caspasa-8 ( $F_{(1,8)}; 22,92$ ;  $P < 0,01$ ), pero no del sexo, ni una interacción entre ambos factores. Los niveles de caspasa-8 estaban incrementados en los animales sometidos a estrés, tanto machos como hembras (Figura 31A).

##### 2.2.1.2.2. Niveles proteicos de caspasa-9.

Se observó un efecto del estrés prenatal sobre los niveles de caspasa-9 ( $F_{(1,8)}; 20,91$ ;  $P < 0,01$ ), pero no del sexo, ni una interacción entre ambos factores. Al analizar los niveles de caspasa-9 se observó el mismo efecto que en el caso de la caspasa-8, es decir, los ratones estresados tenían incrementados los niveles de caspasa-9 (Figura 31B).



**Figura 31:** Niveles relativos de la proteína caspasa-8 fragmentada (**A**) y caspasa-9 fragmentada (**B**) en el hipocampo de ratones control y ratones estresados prenatalmente (EP), machos y hembras a día embrionario 17. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  e.e.m normalizados respecto a los valores de los machos control. Se muestra un gel representativo. **ANOVA:** caspasa-8 ( $P<0,01$ ); caspasa-9 ( $P<0,01$ ); \* estadísticamente significativo respecto grupo control del mismo sexo.  $n=3$ /grupo.

### 2.2.1.3. Efecto del estrés prenatal sobre las proteínas reguladoras de la apoptosis en el hipocampo de embriones de ratón de 17 días, machos y hembras.

#### 2.2.1.3.1. Niveles proteicos de Bcl-2.

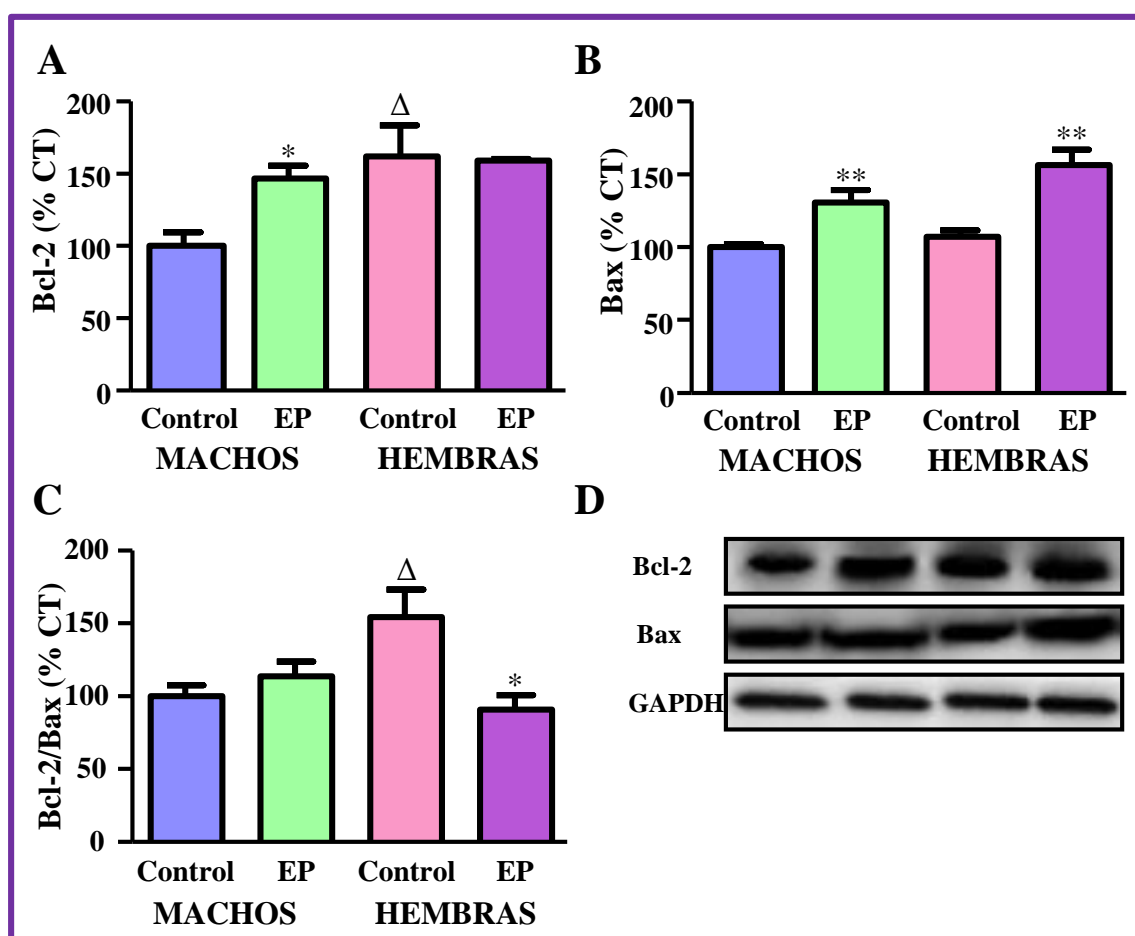
Se observó un efecto del sexo ( $F_{(1,8)}$ : 9,23;  $P<0,05$ ), pero no del estrés prenatal sobre los niveles de Bcl-2, sin existir interacción entre el sexo y el estrés prenatal. Las hembras control tenían mayores niveles de Bcl-2 que los machos control, sin diferencias entre las hembras y los machos estresados. Además, se observó que los machos estresados tenían mayores niveles de Bcl-2 que los controles, sin diferencias entre las hembras estresadas y las controles (Figuras 32A).

#### 2.2.1.3.2. Niveles proteicos de Bax.

Los niveles de Bax estaban afectados por el estrés ( $F_{(1,8)}$ : 30,46;  $P<0,001$ ), pero no por el sexo, sin existir interacción entre el estrés prenatal y el sexo. Los animales estresados, tanto machos como hembras, tenían mayores niveles de Bax que los controles (Figuras 32B).

### 2.2.1.3.3. Ratio Bcl-2/Bax.

Para entender más fácilmente qué estaba ocurriendo con estas proteínas puesto que ambas estaban incrementadas se calculó el ratio Bcl-2/Bax y se observó que existía una interacción entre el estrés prenatal y el sexo ( $F_{(1,8)}: 8,62; P<0,05$ ), sin efecto de ninguno de los factores individualmente. Las hembras control tenían un mayor ratio de Bcl-2/Bax que los machos control, al igual que ocurriera con los niveles de Bcl-2. En las hembras estresadas el ratio era menor que en las hembras control, sin diferencias entre los machos control y los estresados (Figura 32C).



**Figura 32:** Niveles relativos de la proteína Bcl-2 (A), Bax (B) y del ratio Bcl-2/Bax (C) en el hipocampo de ratones control y ratones estresados prenatalmente (EP), machos y hembras a día embrionario 17. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  e.e.m normalizados respecto a los valores de los machos control. Se muestra un gel representativo (D). ANOVA: Bcl-2 ( $P<0,05$ ); Bax ( $P<0,01$ ); Bcl-2/Bax ( $P<0,05$ ); \* estadísticamente significativo respecto grupo control del mismo sexo;  $\Delta$  estadísticamente significativo respecto mismo grupo del sexo contrario. n=3/grupo.



#### 2.2.1.4. Efecto del estrés prenatal sobre los niveles de ARNm de IGF-I y de su receptor en el hipocampo de embriones de ratón de 17 días, machos y hembras.

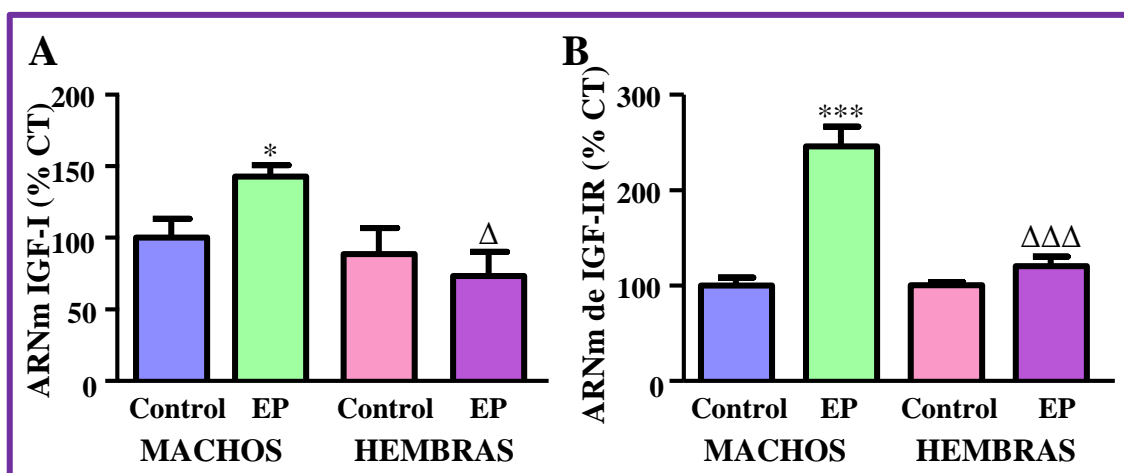
Se midieron mediante RT-PCR los niveles de ARNm de IGF-I y de su receptor en el hipocampo para ver cómo les afectaba el estrés prenatal.

##### 2.2.1.4.1. Niveles de ARNm de IGF-I.

Se observó un efecto del sexo ( $F_{(1,12)}$ : 7,90;  $P<0,05$ ), pero no del estrés prenatal en los niveles de IGF-I, sin existir interacción entre ambos factores. Las hembras estresadas tenían menores niveles de IGF-I que los machos estresados. Los machos estresados tenían mayores niveles de IGF-I que los machos control (t-Student;  $P<0,05$ ), sin cambios entre las hembras control y las estresadas (Figura 33A).

##### 2.2.1.4.2. Niveles de ARNm del receptor de IGF-I.

Los niveles de ARNm del receptor de IGF-I (IGF-IR) estaban afectados tanto por el sexo ( $F_{(1,11)}$ : 19,79;  $P<0,01$ ) como por el estrés prenatal ( $F_{(1,11)}$ : 35,04;  $P<0,001$ ), existiendo una interacción entre ambos factores en estudio ( $F_{(1,11)}$ : 20,08;  $P<0,01$ ). Los machos estresados tenían mayores niveles del receptor de IGF-I que los machos control y que las hembras estresadas, no existiendo diferencias entre las hembras control y las estresadas (Figura 33B).



**Figura 33:** Niveles relativos de ARNm de IGF-I (A) y del receptor de IGF-I (B) en el hipocampo de ratones control y ratones estresados prenatalmente (EP), machos y hembras a día embrionario 17. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  e.e.m normalizados respecto a los valores de los machos control. **ANOVA:** IGF-I ( $P<0,05$ ); IGF-IR ( $P<0,001$ ); **t-Student** (IGF-I Control vs EP machos): ( $P<0,05$ ); \* estadísticamente significativo respecto grupo control del mismo sexo; Δ estadísticamente significativo respecto mismo grupo del sexo contrario. n=3-5/grupo.

### 2.2.1.5. Efecto del estrés prenatal sobre los niveles de GFAP y Tuj-1 en el hipocampo de embriones de ratón de 17 días, machos y hembras.

#### 2.2.1.5.1. Niveles proteicos de GFAP.

Se observó un efecto del estrés prenatal ( $F_{(1,8)}: 5,45; P<0,05$ ), pero no del sexo sobre los niveles de GFAP, existiendo una interacción entre ambos factores ( $F_{(1,8)}: 47,62; P<0,001$ ). Las hembras control tenían mayores niveles de GFAP que los machos control y sin embargo, las hembras estresadas tenían menores niveles de GFAP que los machos estresados. Los machos estresados tenían incrementados los niveles de GFAP respecto a los machos control y, sin embargo, las hembras estresadas los tenían disminuidos (Tabla 5)

#### 2.2.1.5.2. Niveles proteicos de Tuj-1.

En los niveles de Tuj-1 solamente se encontró una interacción entre el sexo y el estrés prenatal ( $F_{(1,8)}: 20,10; P<0,01$ ), sin existir efecto de cada uno de los factores individualmente. Las hembras control tenían mayores niveles de Tuj-1 que los machos control, sin diferencias entre los animales estresados. Además, las hembras estresadas tenían menores niveles de Tuj-1 que las controles, sin diferencias entre los machos (Tabla 5).

	Hipocampo			
	Machos		Hembras	
	Control	EP	Control	EP
<b>GFAP</b>	100,0 ± 7,7	212,7 ± 8,0 <sup>***</sup>	169,6 ± 1,5 <sup>ΔΔΔ</sup>	113,9 ± 21,7 <sup>***ΔΔΔ</sup>
<b>Tuj-1</b>	100,0 ± 7,6	124,2 ± 6,6	142,1 ± 5,5 <sup>ΔΔ</sup>	103,2 ± 1,7 <sup>**</sup>

**Tabla 5:** Niveles relativos de la proteína GFAP y Tuj-1 en el hipocampo de ratones control y ratones estresados prenatalmente (EP), machos y hembras a día embrionario 17. Los resultados se expresan como medias ± e.e.m normalizados respecto a los valores de los machos control. **ANOVA:** GFAP ( $P<0,001$ ); Tuj-I ( $P<0,01$ ); \* estadísticamente significativo respecto grupo control del mismo sexo; Δ estadísticamente significativo respecto mismo grupo del sexo contrario. n=3/grupo.

## 2.2.2. HIPOTÁLAMO

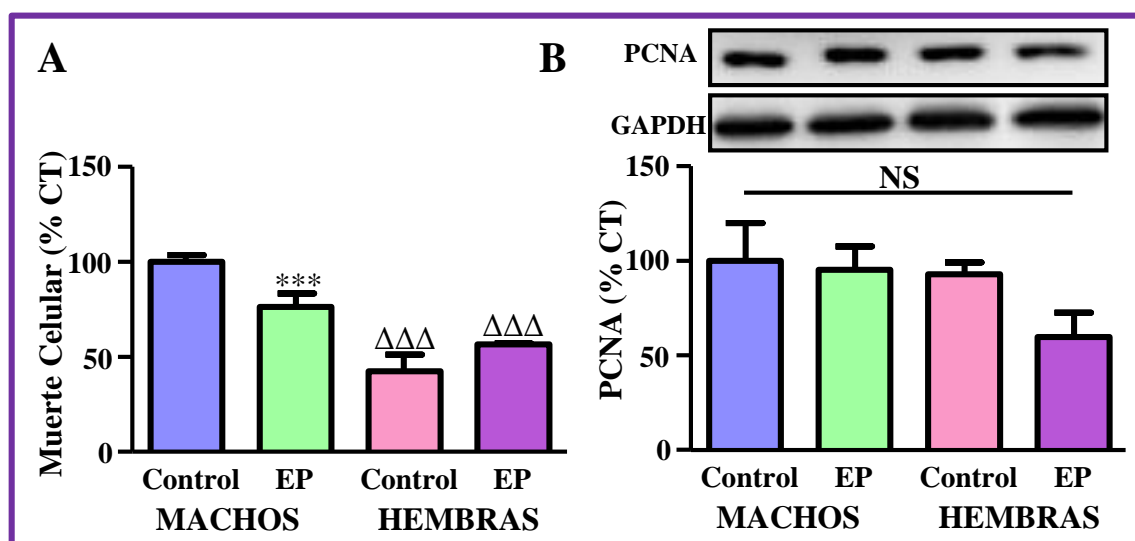
### 2.2.2.1. Efecto del estrés prenatal sobre los niveles de muerte celular y proliferación en el hipotálamo de embriones de ratón de 17 días, machos y hembras.

#### 2.2.2.1.1. Muerte celular.

Se observó un efecto del sexo ( $F_{(1,8)}$ : 43,46;  $P<0,001$ ), pero no del estrés prenatal sobre los niveles de muerte celular, existiendo una interacción entre ambos factores ( $F_{(1,8)}$ : 10,33;  $P<0,05$ ). Las hembras, tanto control como estresadas tenían menores niveles de muerte celular que los machos. Los ratones macho estresados tenían menores niveles de muerte celular que los machos control, sin diferencias entre las hembras control y las estresadas (Figura 34A).

#### 2.2.2.1.2. Niveles proteicos de PCNA.

Los niveles de PCNA no se modificaron ni por el estrés prenatal, ni por el sexo, no existiendo interacción entre ambos factores. No se observaron diferencias significativas entre ninguno de los grupos en estudio (Figura 34B).



**Figura 34:** Niveles relativos de muerte celular (A) y de la proteína PCNA (B) en el hipotálamo de ratones control y ratones estresados prenatalmente (EP), machos y hembras a día embrionario 17. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  e.e.m normalizados respecto a los valores de los machos control. Se muestra un gel representativo. **ANOVA:** Muerte ( $P<0,001$ ); PCNA (NS: no significativo); \* estadísticamente significativo respecto grupo control del mismo sexo; Δ estadísticamente significativo respecto mismo grupo del sexo contrario.  $n=3$ /grupo.

### 2.2.2.2. Efecto del estrés prenatal sobre las vías de muerte celular en el hipotálamo de embriones de ratón de 17 días, machos y hembras.

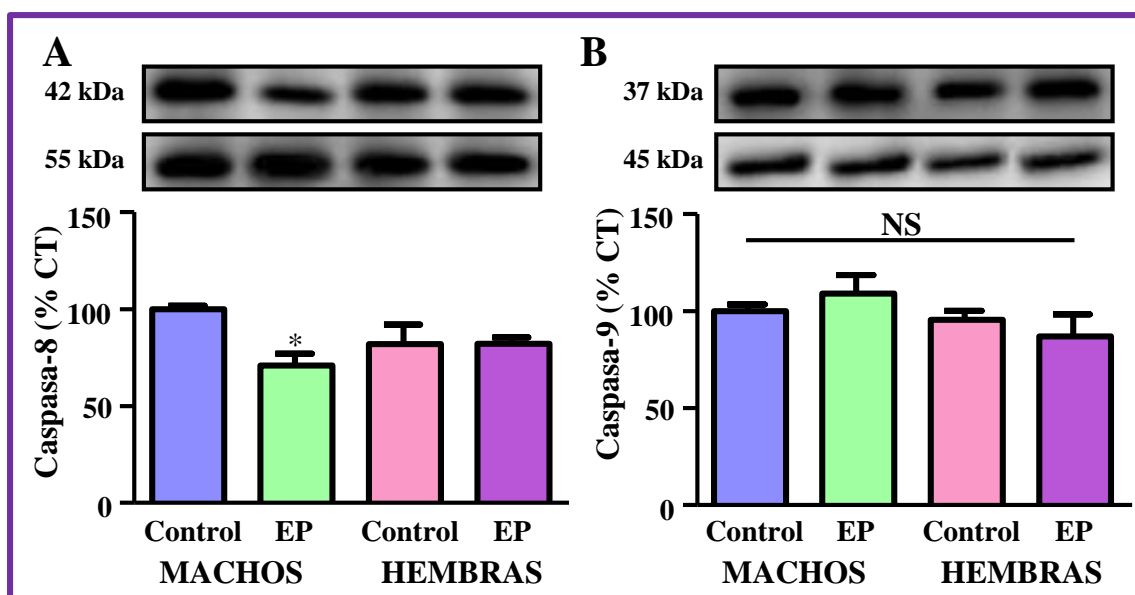
Se analizaron los niveles de caspasa-8 y caspasa-9.

#### 2.2.2.2.1. Niveles proteicos de caspasa-8.

Se observó un efecto del estrés prenatal ( $F_{(1,8)}: 5,20; P<0,05$ ), pero no del sexo sobre los niveles de caspasa-8, existiendo una interacción entre ambos factores ( $F_{(1,8)}: 5,39; P<0,05$ ). Los niveles de caspasa-8 en el hipotálamo estaban disminuidos en los ratones macho estresados prenatalmente y no se modificaron en las hembras (Figura 35A).

#### 2.2.2.2.2. Niveles proteicos de caspasa-9.

Los niveles de caspasa-9 no se modificaron ni por efecto del estrés prenatal, ni por efecto del sexo, no existiendo interacción entre ambos factores. No se observaron diferencias entre los animales estresados y los controles en ninguno de los dos sexos (Figura 35B).



**Figura 35:** Niveles relativos de la proteína caspasa-8 fragmentada (**A**) y caspasa-9 fragmentada (**B**) en el hipotálamo de ratones control y ratones estresados prenatalmente (EP), machos y hembras a día embrionario 17. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  e.e.m normalizados respecto a los valores de los animales control. Se muestra un gel representativo. **ANOVA:** Caspasa-8 ( $P<0,001$ ); caspasa-9 (NS: no significativo); \* estadísticamente significativo respecto grupo control del mismo sexo.  $n=3/\text{grupo}$ .

### **2.2.2.3. Efecto del estrés prenatal sobre las proteínas reguladoras de la apoptosis en el hipotálamo de embriones de ratón de 17 días, machos y hembras.**

#### **2.2.2.3.1. Niveles proteicos de Bcl-2.**

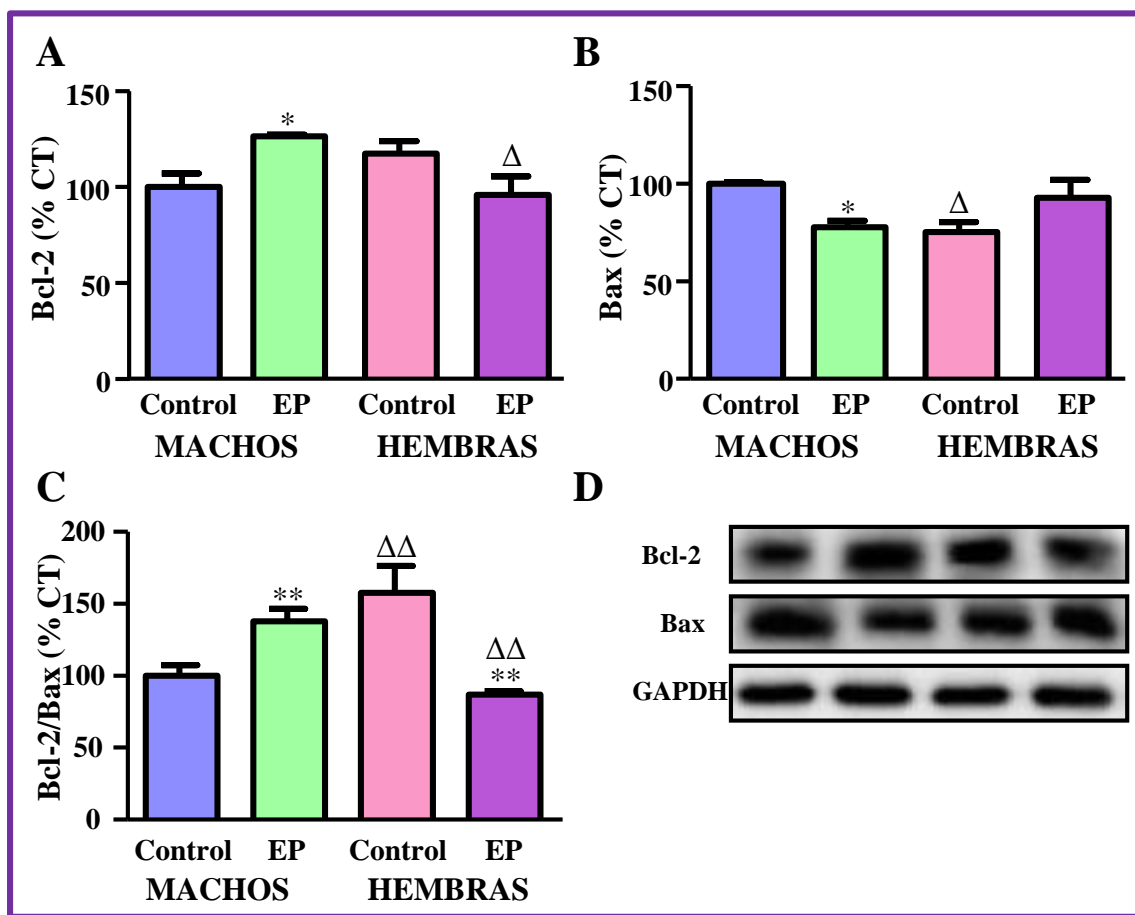
Se observó una interacción entre el estrés prenatal y el sexo en los niveles de Bcl-2 ( $F_{(1,8)}: 13,85; P<0,01$ ), sin efecto de ninguno de los factores individualmente. Las hembras estresadas tenían menores niveles de Bcl-2 que los machos estresados y los machos estresados tenían mayores niveles de Bcl-2 que los machos control, sin diferencias entre las hembras control y las estresadas (Figura 36A).

#### **2.2.2.3.2. Niveles proteicos de Bax.**

Se observó una interacción entre el estrés prenatal y el sexo en los niveles de Bax ( $F_{(1,8)}: 14,21; P<0,01$ ), sin efecto de ninguno de los factores individualmente. Las hembras control tenían menores niveles de Bax que los machos control. Los machos estresados tenían menores niveles de Bax que los machos control, sin diferencias entre las hembras (Figura 36B).

#### **2.2.2.3.3. Ratio Bcl-2/Bax.**

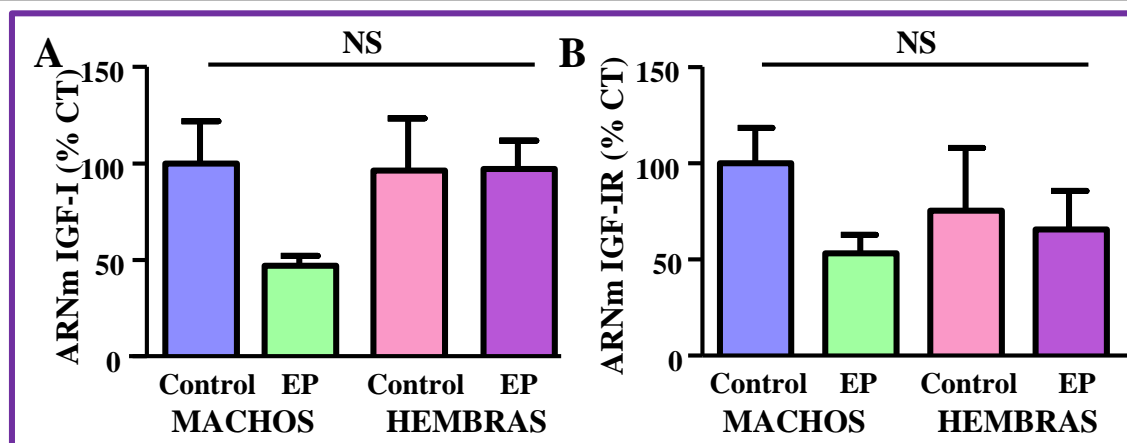
Se observó una interacción entre el estrés prenatal y el sexo en los niveles del ratio Bcl-2/Bax ( $F_{(1,8)}: 24,75; P=0,001$ ), sin efecto de ninguno de los factores individualmente. Las hembras control tenían mayores niveles del ratio Bcl-2/Bax que los machos control y, sin embargo, las hembras estresadas tenían menores niveles de dicho ratio que los machos estresados. Además, se observó que los machos estresados tenían mayores niveles de Bcl-2/Bax que los controles y las hembras estresadas menores (Figura 36C).



**Figura 36:** Niveles relativos de la proteína Bcl-2 (A), Bax (B) y del ratio Bcl-2/Bax (C) en el hipotálamo de ratones control y ratones estresados prenatalmente (EP), machos y hembras a día embrionario 17. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  e.e.m normalizados respecto a los valores de los machos control. Se muestra un gel representativo (D). ANOVA: Bcl-2 ( $P < 0,05$ ); Bax ( $P < 0,05$ ); Bcl-2/Bax ( $P < 0,01$ ); \* estadísticamente significativo respecto grupo control del mismo sexo;  $\Delta$  estadísticamente significativo respecto mismo grupo del sexo contrario.  $n=3$ /grupo.

#### 2.2.2.4. Efecto del estrés prenatal sobre los niveles de ARNm de IGF-I y de su receptor en el hipotálamo de embriones de ratón de 17 días, machos y hembras.

En el hipotálamo los niveles de IGF-I y del receptor no estaban afectados ni por el sexo, ni por el estrés prenatal y no existió interacción entre ambos factores. No se observaron diferencias significativas entre ninguno de los grupos en estudio ni en IGF-I, ni en el receptor de IGF-I (Figuras 37A y 37B, respectivamente).



**Figura 37:** Niveles relativos de ARNm de IGF-I (A) y del receptor de IGF-I (B) en el hipotálamo de ratones control y ratones estresados prenatalmente (EP), machos y hembras a día embrionario 17. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  e.e.m normalizados respecto a los valores de los machos control. ANOVA: NS: no significativo.  $n=3-5$ /grupo.

#### 2.2.2.5. Efecto del estrés prenatal sobre los niveles de GFAP y Tuj-1 en el hipotálamo de embriones de ratón de 17 días, machos y hembras.

##### 2.2.2.5.1. Niveles proteicos de GFAP.

Se observó un efecto del estrés prenatal ( $F_{(1,8)}$ : 6,19;  $P<0,05$ ), pero no del sexo sobre los niveles de GFAP, existiendo una interacción entre ambos factores ( $F_{(1,8)}$ : 6,37;  $P<0,05$ ). Las hembras estresadas tenían menores niveles de GFAP que las hembras control y que los machos estresados (Tabla 6).

##### 2.2.2.5.2. Niveles proteicos de Tuj-1.

Se observó un efecto del estrés prenatal ( $F_{(1,8)}$ : 18,27;  $P<0,01$ ), pero no del sexo sobre los niveles de Tuj-1, sin existir interacción entre ambos factores. Los animales estresados tenían menores niveles de Tuj-1 que los animales control (machos t-Student  $P<0,01$ ) (Tabla 6).

	Hipotálamo			
	Machos		Hembras	
	Control	EP	Control	EP
<b>GFAP</b>	100,0 $\pm$ 6,7	100,3 $\pm$ 10,0	106,7 $\pm$ 5,4	70,0 $\pm$ 3,5 <sup>*Δ</sup>
<b>Tuj-1</b>	100,0 $\pm$ 2,2	86,8 $\pm$ 2,2 <sup>**</sup>	106,8 $\pm$ 6,0	90,0 $\pm$ 2,0 <sup>**</sup>

**Tabla 6:** Niveles relativos de la proteína GFAP y Tuj-1 en el hipotálamo de ratones control y ratones estresados prenatalmente (EP), machos y hembras a día embrionario 17. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  e.e.m normalizados respecto a los valores de los ratones control. ANOVA: GFAP ( $P<0,05$ ); Tuj-1 ( $P<0,01$ ); t-Student (Tuj-1 Control vs EP machos): ( $P<0,01$ ); \* estadísticamente significativo respecto grupo control del mismo sexo; Δ estadísticamente significativo respecto mismo grupo del sexo contrario.  $n=3$ /grupo.

## **2.3. EFECTO DEL ESTRÉS PRENATAL EN EL RECAMBIO CELULAR EN EL HIPOCAMPO Y EL HIPOTÁLAMO DE RATONES MACHO Y HEMBRA ALIMENTADOS CON UNA DIETA RICA EN SACAROSA INTRODUCIDA EN LA ETAPA ADULTA**

### **2.3.1. HIPOCAMPO**

#### **2.3.1.1. Efecto del estrés prenatal sobre los niveles de muerte celular y proliferación en el hipocampo de ratones macho y hembra alimentados con una dieta rica en sacarosa introducida en la etapa adulta.**

##### **2.3.1.1.1. Muerte celular.**

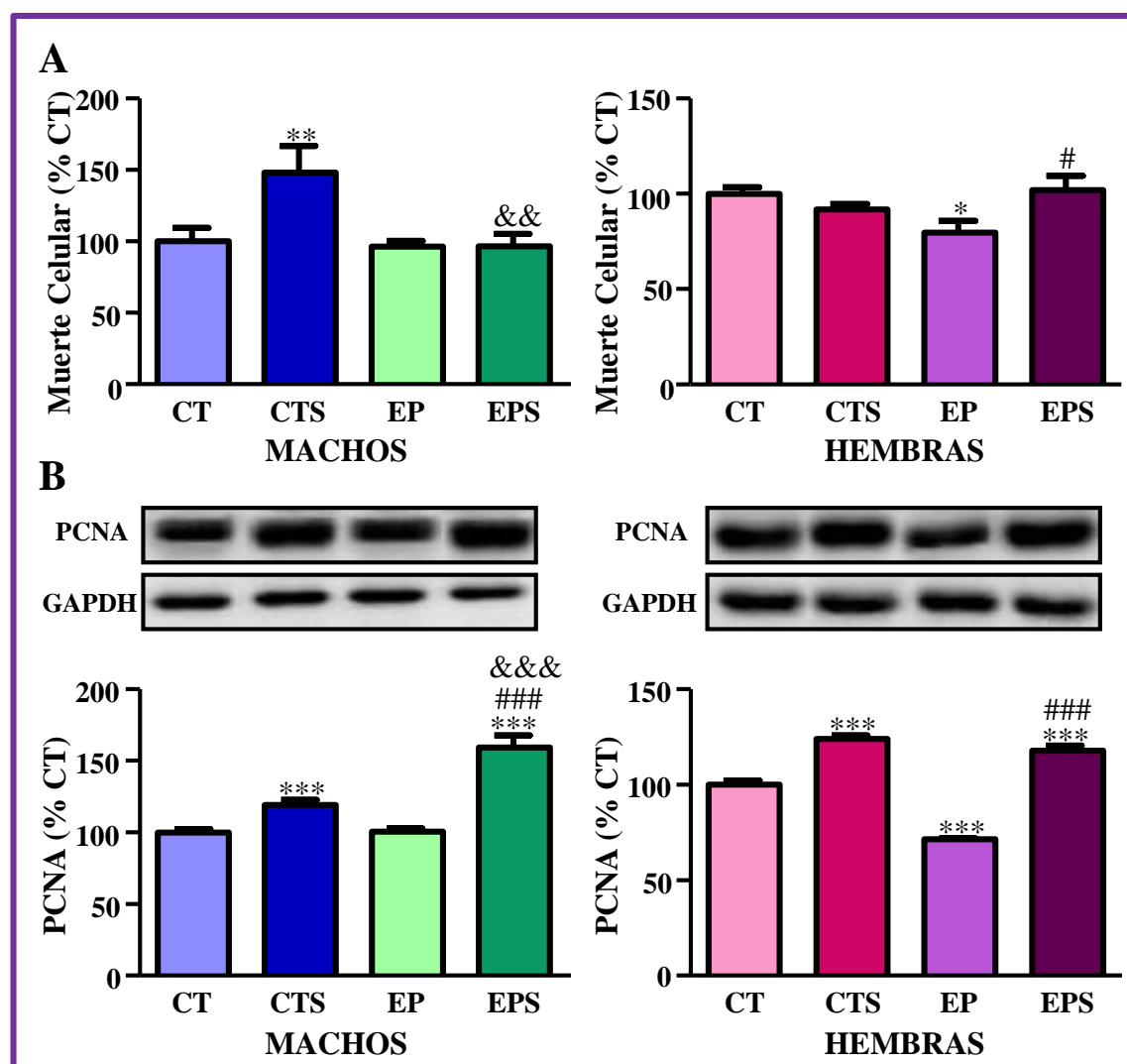
Se encontró un efecto tanto del estrés prenatal ( $F_{(1,8)}: 6,01; P<0,05$ ) como de la ingesta de sacarosa ( $F_{(1,8)}: 4,57; P<0,05$ ) en los niveles de muerte celular en el hipocampo de los ratones macho, existiendo una interacción entre ambos factores ( $F_{(1,8)}: 4,49; P<0,05$ ). Los niveles de muerte celular de los ratones macho estaban incrementados en el grupo CTS con respecto al grupo CT y al grupo EPS, no observándose diferencias entre ambos grupos de ratones estresados (EP y EPS) y los ratones CT (Figura 38A izquierda). En las hembras, únicamente se encontró una interacción entre el estrés prenatal y la ingesta de sacarosa ( $F_{(1,8)}: 7,38; P<0,05$ ), sin observarse efecto de ninguno de los factores individualmente. En las hembras EP los niveles de muerte celular eran menores que los del grupo CT. La ingesta de sacarosa tuvo un efecto diferencial, ya que, no modificó los niveles de muerte celular en las hembras CTS y los incrementó en el grupo EPS respecto al grupo EP (Figura 38A derecha).

##### **2.3.2.2.2. Niveles proteicos de PCNA.**

Los niveles de PCNA se vieron afectados tanto en machos como en hembras, por el estrés prenatal (machos  $F_{(1,8)}: 17,30; P<0,01$ ; hembras  $F_{(1,8)}: 70,99; P<0,0001$ ) y por la ingesta de sacarosa (machos  $F_{(1,8)}: 71,22; P<0,0001$ ; hembras  $F_{(1,8)}: 290,20; P<0,0001$ ), existiendo una interacción entre ambos factores (machos  $F_{(1,8)}: 16,54; P<0,01$ ; hembras  $F_{(1,8)}: 29,83; P<0,01$ ). Los niveles de PCNA estaban incrementados en los ratones macho CTS y EPS, siendo este incremento más acusado y significativamente mayor en el grupo EPS que en el grupo CTS, sin embargo, no se observaron diferencias entre los machos CT y EP (Figura 38B izquierda). Las hembras EP tenían menores niveles de PCNA que el



grupo CT, sin embargo, las hembras CTS y EPS tenían incrementados los niveles de PCNA respecto a las CT y las EP (Figura 38B derecha).



**Figura 38:** Niveles relativos de muerte celular (A) y de la proteína PCNA (B) en el hipocampo de ratones macho y hembra procedentes de madres control y madres estresadas durante la gestación y alimentados durante las dos semanas anteriores al sacrificio con pienso y agua o con pienso y una solución de sacarosa al 33%. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  e.e.m normalizados respecto a los valores de los animales control. Se muestra un gel representativo. **ANOVA:** Muerte machos ( $P<0,01$ ); muerte hembras ( $P<0,05$ ); PCNA machos ( $P<0,0001$ ); PCNA hembras ( $P<0,0001$ ); \* estadísticamente significativo respecto grupo CT; # estadísticamente significativo respecto grupo EP; & estadísticamente significativo respecto grupo CTS.  $n=3$ /grupo.

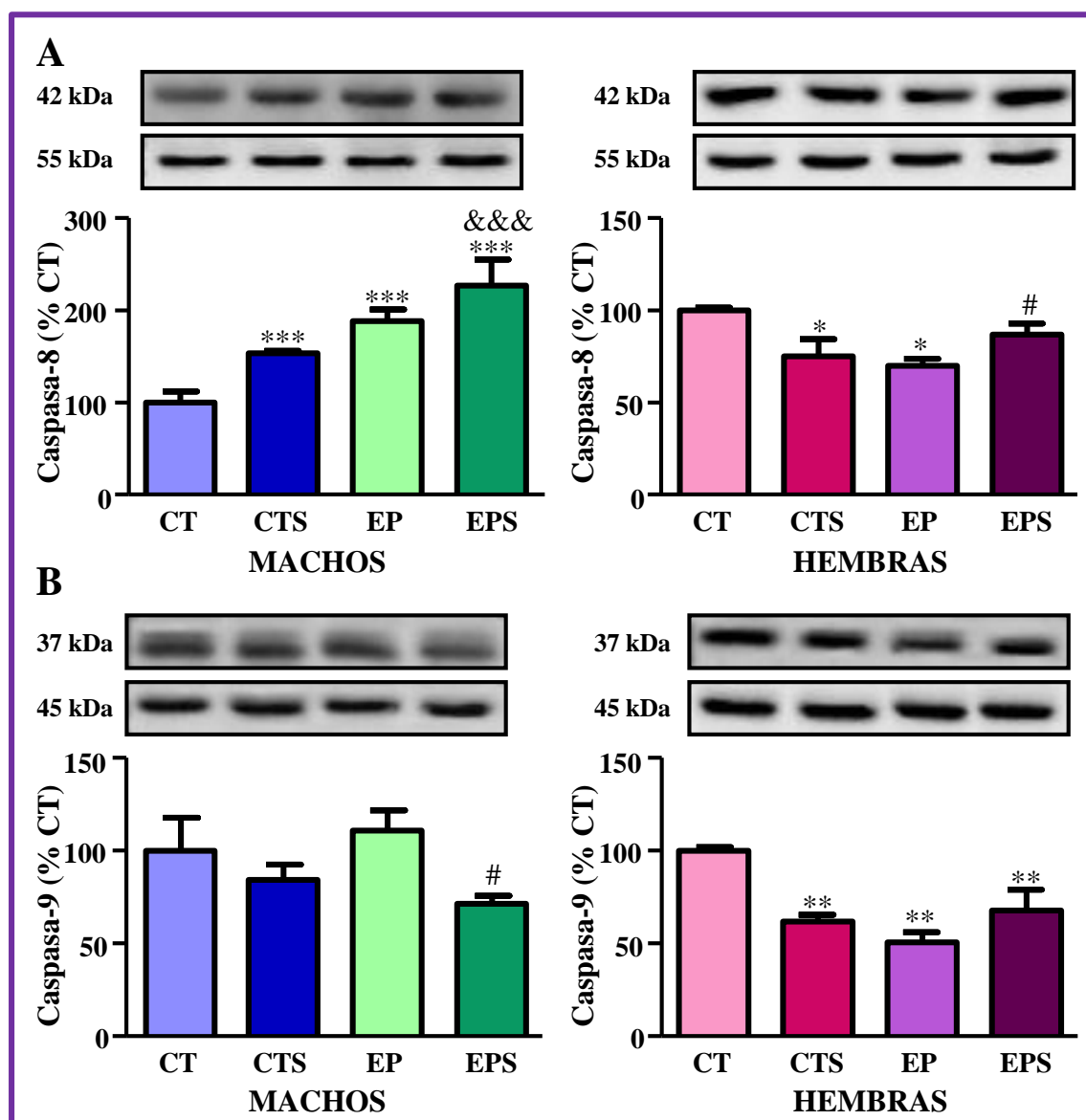
**2.3.1.2. Efecto del estrés prenatal sobre las vías de muerte celular en el hipocampo de ratones macho y hembra alimentados con una dieta rica en sacarosa introducida en la etapa adulta.**

**2.3.1.2.1. Niveles proteicos de caspasa-8.**

Se encontró un efecto tanto del estrés prenatal ( $F_{(1,8)}$ : 23,41;  $P<0,01$ ) como de la ingesta de sacarosa ( $F_{(1,8)}$ : 7,61;  $P<0,05$ ) en los niveles de caspasa-8 en el hipocampo de los ratones macho, sin existir una interacción entre ambos factores. Los ratones macho EP y EPS tenían mayores niveles de caspasa-8 que los CT. La ingesta de sacarosa tuvo un efecto diferencial entre los ratones control y los estresados, ya que en los machos CTS incrementó los niveles de caspasa-8 y, sin embargo, en los machos EPS no los modificó respecto a los EP (Figura 39A izquierda). En las hembras, únicamente se encontró una interacción entre el estrés prenatal y la ingesta de sacarosa ( $F_{(1,8)}$ : 17,89;  $P<0,01$ ), sin observarse efecto de ninguno de los factores individualmente. Las hembras EP tenían disminuidos los niveles de caspasa-8 con respecto al grupo CT. La ingesta de sacarosa de nuevo tuvo un efecto diferencial entre las hembras control y las estresadas, ya que las hembras del grupo CTS tenían menores niveles de caspasa-8 que las del grupo CT y sin embargo, incrementó los niveles de caspasa-8 en el grupo EPS respecto al grupo EP (t-Student  $P<0,05$ ) (Figura 39A derecha).

**2.3.1.2.2. Niveles proteicos de caspasa-9.**

Los niveles de caspasa-9 en el hipocampo de los machos estaban afectados por la ingesta de sacarosa ( $F_{(1,8)}$ : 9,93;  $P<0,01$ ), pero no por el estrés prenatal, sin existir interacción entre ambos factores. Los machos EPS tenían menores niveles de caspasa-9 que los machos EP, sin observarse diferencias entre el resto de los grupos (Figura 39B izquierda). En las hembras se encontró un efecto del estrés prenatal ( $F_{(1,8)}$ : 10,86;  $P<0,05$ ), pero no de la ingesta de sacarosa, existiendo una interacción entre ambos factores ( $F_{(1,8)}$ : 17,95;  $P<0,01$ ). Al analizar los niveles de caspasa-9 en las hembras se observó que tanto las hembras estresadas (EP y EPS) como las CTS tenían menores niveles de caspasa-9 que las hembras control, sin existir diferencias entre los grupos EP y EPS (Figura 39B derecha).



**Figura 39:** Niveles relativos de la proteína caspasa-8 fragmentada (**A**) y caspasa-9 fragmentada (**B**) en el hipocampo de ratones macho y hembra procedentes de madres control y madres estresadas durante la gestación y alimentados durante las dos semanas anteriores al sacrificio con pienso y agua o con pienso y una solución de sacarosa al 33%. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  e.e.m normalizados respecto a los valores de los animales control. Se muestra un gel representativo. **ANOVA:** Caspasa-8 machos ( $P<0,001$ ); caspasa-8 hembras ( $P<0,05$ ); caspasa-9 machos ( $P<0,05$ ); caspasa-9 hembras ( $P<0,01$ ); **t-Student** (caspasa-8 hembras EP vs EPS):  $P<0,05$ ; \* estadísticamente significativo respecto grupo CT; # estadísticamente significativo respecto grupo EP; & estadísticamente significativo respecto grupo CTS.  $n=3/\text{grupo}$ .

### **2.3.1.3. Efecto del estrés prenatal sobre proteínas reguladoras de la apoptosis en el hipocampo de ratones macho y hembra alimentados con una dieta rica en sacarosa introducida en la etapa adulta.**

#### **2.3.1.3.1. Niveles proteicos de Bcl-2.**

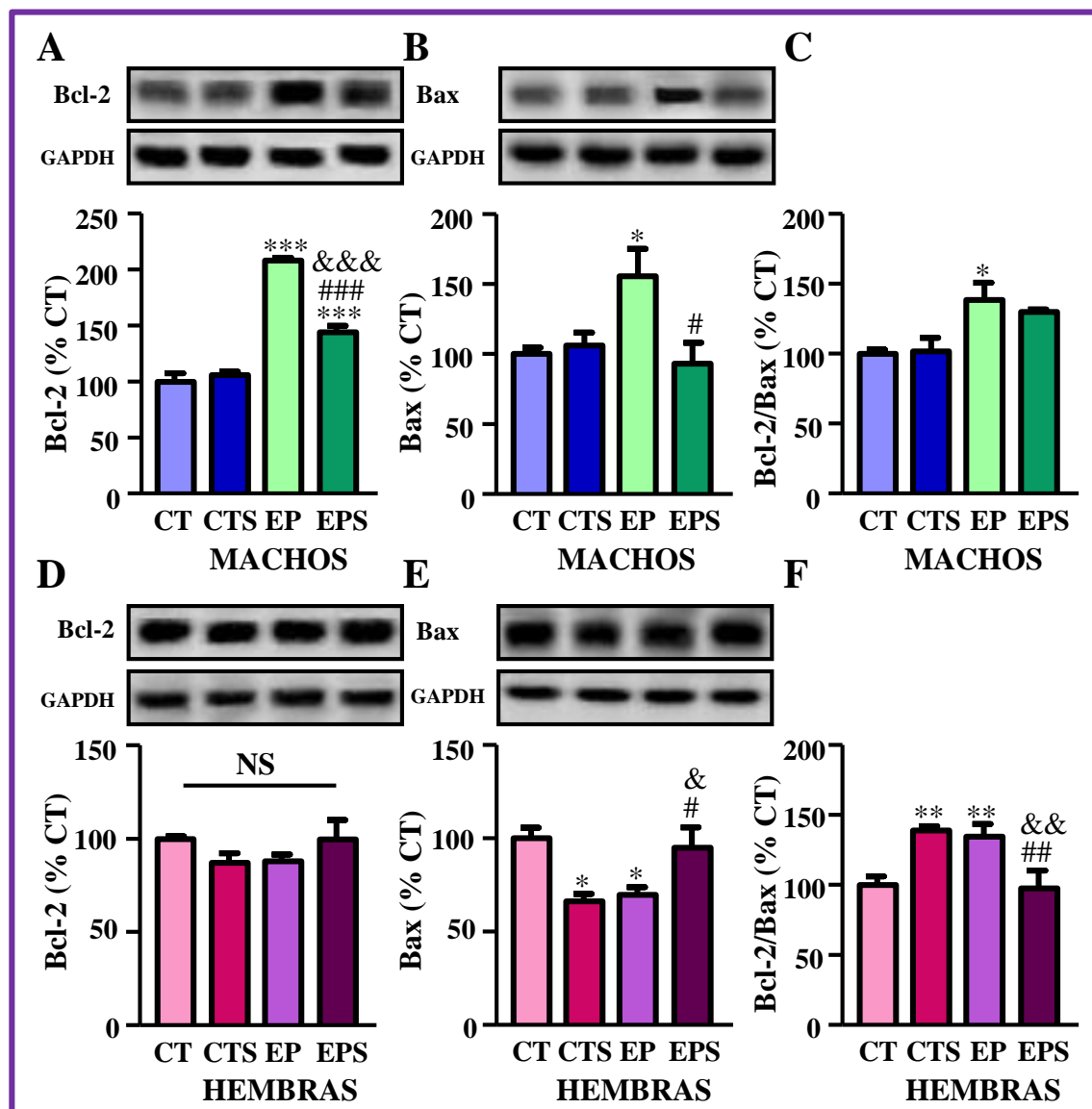
Se observó un efecto del estrés prenatal ( $F_{(1,8)}$ : 219,90;  $P < 0,0001$ ), de la ingesta de sacarosa ( $F_{(1,8)}$ : 34,53;  $P < 0,001$ ) y una interacción entre ambos factores ( $F_{(1,8)}$ : 50,31;  $P < 0,001$ ) en los niveles de Bcl-2 en el hipocampo de los ratones macho. Los niveles de Bcl-2 estaban incrementados en los machos EP y EPS. La ingesta de sacarosa no modificó los niveles de Bcl-2 en los machos CT y los disminuyó en los machos EPS respecto a los machos EP (Figura 40A). En las hembras, no hubo efecto de ninguno de los factores, ni interacción entre ambos en los niveles de Bcl-2, no observándose diferencias entre los distintos grupos de hembras (Figura 40D).

#### **2.3.1.3.2. Niveles proteicos de Bax.**

Los niveles de Bax, tanto en machos como en hembras, no se vieron modificados ni por el estrés prenatal, ni por la ingesta de sacarosa, únicamente se observó una interacción entre ambos factores (machos  $F_{(1,8)}$ : 6,56;  $P < 0,05$ ; hembras  $F_{(1,8)}$ : 18,57;  $P < 0,01$ ). Los niveles de Bax estaban incrementados en los machos EP. La ingesta de sacarosa no modificó estos niveles en el grupo control y los disminuyó en el grupo EPS respecto al grupo EP, no habiendo diferencias entre los EPS y los CT (Figura 40B). En las hembras, se observó que los niveles de Bax estaban disminuidos en las CTS y en las EP respecto a las CT y las EPS (Figura 40E).

#### **2.3.1.3.3. Ratio Bcl-2/Bax.**

Se observó un efecto del estrés prenatal ( $F_{(1,8)}$ : 15,85;  $P < 0,01$ ), pero no de la ingesta de sacarosa sobre los niveles del ratio Bcl-2/Bax, sin existir interacción entre ambos factores. El ratio Bcl-2/Bax era mayor en los machos EP que en los CT, sin diferencias entre el resto de los grupos (Figura 40C). Los niveles del ratio Bcl-2/Bax en hembras no se vieron modificados ni por el estrés prenatal, ni por la ingesta de sacarosa, únicamente se observó una interacción entre ambos factores ( $F_{(1,8)}$ : 23,65;  $P < 0,001$ ). El ratio Bcl-2/Bax estaba incrementado en las hembras CTS y EP. Las EPS tenían menor ratio respecto al grupo EP y al CTS, sin estar modificado respecto al grupo CT (Figura 40F).



**Figura 40:** Niveles relativos de la proteína Bcl-2 (A, D) y Bax (B, E) y ratio Bcl-2/Bax (C, F) en el hipocampo de ratones macho y hembra procedentes de madres control y madres estresadas durante la gestación y alimentados durante las dos semanas anteriores al sacrificio con pienso y agua o con pienso y una solución de sacarosa al 33%. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  e.e.m normalizados respecto a los valores de los animales control. Se muestra un gel representativo. ANOVA: Bcl-2 machos ( $P < 0,0001$ ); Bcl-2 hembras (NS: no significativo); Bax machos ( $P < 0,05$ ); Bax hembras ( $P < 0,05$ ); Bcl-2/Bax machos ( $P < 0,05$ ); Bcl-2/Bax hembras ( $P < 0,01$ ); \* estadísticamente significativo respecto grupo CT; # estadísticamente significativo respecto grupo EP; & estadísticamente significativo respecto grupo CTS.  $n=3/\text{grupo}$ .

#### 2.3.1.4. Efecto del estrés prenatal sobre GFAP y Tuj-1 en el hipocampo de ratones macho y hembra alimentados con una dieta rica en sacarosa introducida en la etapa adulta.

Los niveles de GFAP en el hipocampo de los ratones macho se vieron afectados por el estrés prenatal ( $F_{(1,8)}$ : 91,09;  $P<0,0001$ ) y la ingesta de sacarosa ( $F_{(1,8)}$ : 62,83;  $P<0,0001$ ), existiendo una interacción entre ambos factores ( $F_{(1,8)}$ : 151,70;  $P<0,0001$ ). En los niveles de Tuj-1 únicamente se observó una interacción entre el estrés prenatal y la ingesta de sacarosa ( $F_{(1,8)}$ : 21,18;  $P<0,01$ ), sin efecto de ninguno de los factores individualmente. Los machos EP y los CTS tenían mayores niveles de GFAP y Tuj-1 que los machos CT. Sin embargo, los machos EPS tenían menores niveles de ambas proteínas que los EP, no existiendo diferencias entre los machos EPS y los CT (Tabla 7).

En las hembras, únicamente se encontró efecto del estrés prenatal ( $F_{(1,8)}$ : 29,44;  $P<0,001$ ) sobre los niveles de GFAP, sin efecto de la ingesta de sacarosa, ni interacción entre ambos factores. Los niveles de Tuj-1 en las hembras estaban afectados por el estrés prenatal ( $F_{(1,8)}$ : 113,40;  $P<0,0001$ ), pero no por la ingesta de sacarosa, existiendo una interacción entre ambos factores ( $F_{(1,8)}$ : 8,24;  $P<0,05$ ). Las hembras EP y EPS tenían incrementados los niveles de GFAP y disminuidos los de Tuj-1 respecto a las hembras CT, sin diferencias entre las EP y las EPS. Las CTS tenían menores niveles de Tuj-1 que las CT, sin diferencias en GFAP (Tabla 7).

	HIPOCAMPO			
	CT	CTS	EP	EPS
<b>GFAP (machos)</b>	100,0 $\pm$ 6,8	119,6 $\pm$ 3,0 <sup>***</sup>	197,4 $\pm$ 4,8 <sup>***</sup>	107,2 $\pm$ 1,4 <sup>###</sup>
<b>GFAP (hembras)</b>	100,0 $\pm$ 3,4	84,8 $\pm$ 2,1	126,2 $\pm$ 5,2 <sup>**</sup>	130,2 $\pm$ 9,1 <sup>**&amp;&amp;</sup>
<b>Tuj-1 (machos)</b>	100,0 $\pm$ 7,4	119,6 $\pm$ 3,8 <sup>**</sup>	121,7 $\pm$ 1,7 <sup>**</sup>	99,1 $\pm$ 0,2 <sup>##&amp;&amp;</sup>
<b>Tuj-1 (hembras)</b>	100,0 $\pm$ 3,0	88,9 $\pm$ 2,2 <sup>***</sup>	67,7 $\pm$ 2,2 <sup>***</sup>	70,2 $\pm$ 2,0 <sup>***&amp;&amp;&amp;</sup>

**Tabla 7:** Niveles relativos de la proteína GFAP y Tuj-1 en el hipocampo de ratones macho y hembra procedentes de madres control y madres estresadas durante la gestación y alimentados durante las dos semanas anteriores al sacrificio con pienso y agua o con pienso y una solución de sacarosa al 33%. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  e.e.m normalizados respecto a los valores de los animales control. **ANOVA:** GFAP machos ( $P<0,0001$ ); GFAP hembras ( $P<0,01$ ); Tuj-1 machos ( $P<0,01$ ); Tuj-1 hembras ( $P<0,0001$ ); \* estadísticamente significativo respecto grupo CT; # estadísticamente significativo respecto grupo EP; & estadísticamente significativo respecto grupo CTS. n=3/grupo.

## 2.3.2. HIPOTÁLAMO

### 2.3.2.1. Efecto del estrés prenatal sobre los niveles de muerte celular y proliferación en el hipotálamo de ratones macho y hembra alimentados con una dieta rica en sacarosa introducida en la etapa adulta.

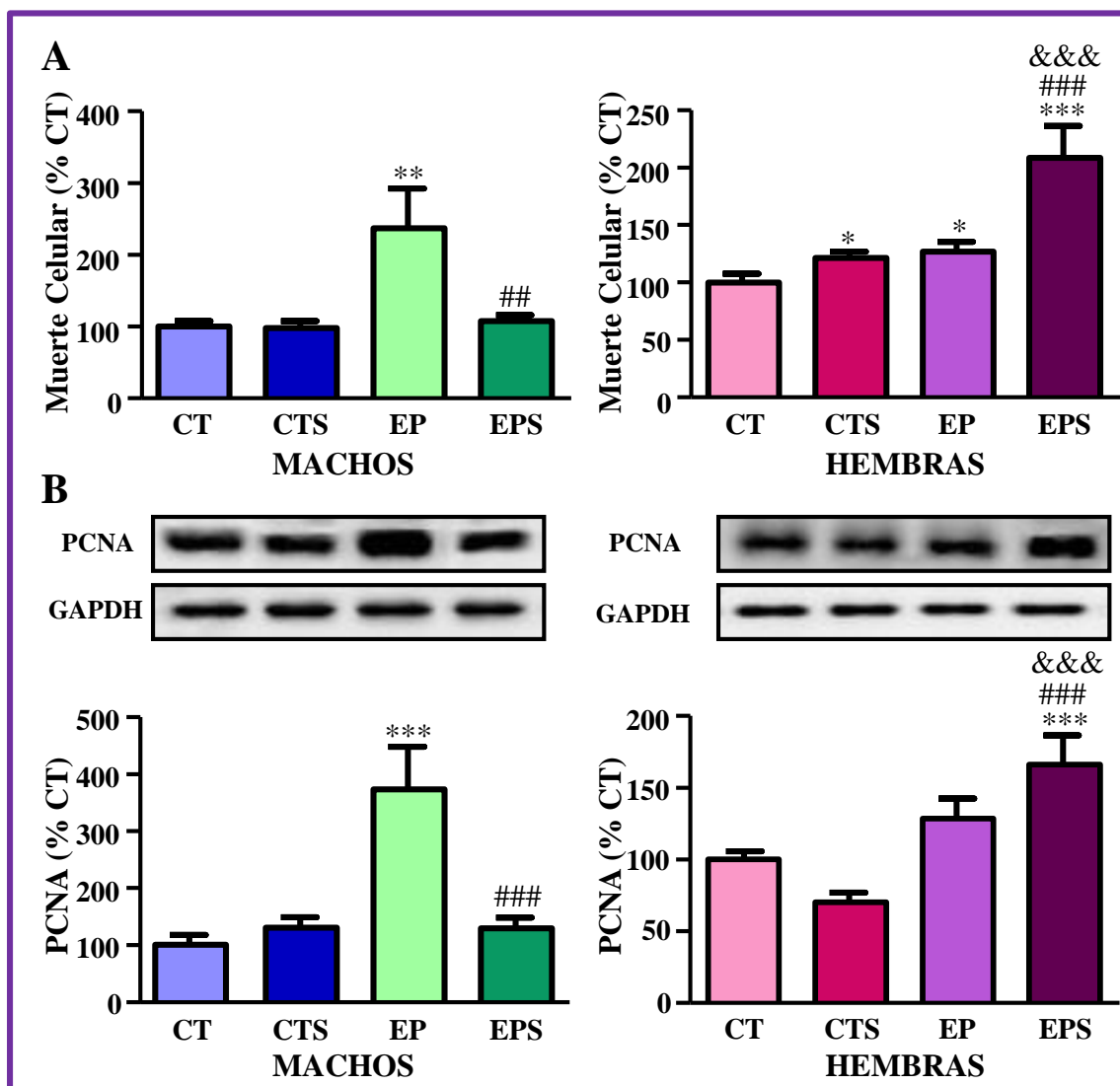
#### 2.3.2.1.1. Muerte celular.

Se observó un efecto, tanto en machos como en hembras, del estrés prenatal (machos  $F_{(1,8)}$ : 11,99;  $P<0,01$ ; hembras  $F_{(1,8)}$ : 14,66;  $P<0,01$ ) y de la ingesta de sacarosa (machos  $F_{(1,8)}$ : 9,54;  $P<0,01$ ; hembras  $F_{(1,8)}$ : 12,02;  $P<0,01$ ) sobre los niveles de muerte celular en el hipotálamo, existiendo una interacción entre ambos factores (machos  $F_{(1,18)}$ : 9,00;  $P=0,01$ ; hembras  $F_{(1,8)}$ : 4,145;  $P<0,05$ ). Los niveles de muerte celular de los machos EP eran mayores que en los CT. La ingesta de sacarosa tuvo un efecto diferencial ya que disminuyó los niveles de muerte celular en los EPS respecto a los EP y no modificó dichos niveles en los CTS (Figura 41A izquierda). En las hembras, se observó que tanto el grupo EP como el CTS tenían mayores niveles de muerte celular que las hembras CT (t-Student  $P<0,05$ ). En el grupo EPS la combinación de ambos factores indujo un incremento de la muerte celular mucho más acusado que el inducido por cada uno de los factores (Figura 41A derecha).

#### 2.3.2.1.2. Niveles proteicos de PCNA.

Se observó un efecto del estrés prenatal ( $F_{(1,8)}$ : 10,49;  $P<0,01$ ) y de la ingesta de sacarosa ( $F_{(1,8)}$ : 6,99;  $P<0,01$ ) sobre los niveles de PCNA en el hipotálamo de los ratones macho, existiendo una interacción entre ambos factores ( $F_{(1,8)}$ : 10,84;  $P<0,01$ ). Los niveles de PCNA estaban incrementados en los machos EP y la ingesta de sacarosa solo tuvo efecto sobre éstos, disminuyéndolos (Figura 41B izquierda).

En las hembras únicamente se observó efecto del estrés prenatal ( $F_{(1,8)}$ : 17,62;  $P<0,001$ ), existiendo una interacción entre el estrés prenatal y la ingesta de sacarosa ( $F_{(1,8)}$ : 4,31;  $P<0,05$ ). Los niveles de PCNA no se modificaron en las hembras EP y la ingesta de sacarosa tuvo un efecto diferencial ya que sólo aumentó los niveles de PCNA en las estresadas, sin modificarlos en las CT (Figura 41B derecha).



**Figura 41:** Niveles relativos de muerte celular (A) y de la proteína PCNA (B) en el hipotálamo de ratones macho y hembra procedentes de madres control y madres estresadas durante la gestación y alimentados durante las dos semanas anteriores al sacrificio con pienso y agua o con pienso y una solución de sacarosa al 33%. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  e.e.m normalizados respecto a los valores de los animales control. Se muestra un gel representativo. **ANOVA:** Muerte machos ( $P < 0,01$ ); muerte hembras ( $P < 0,001$ ); PCNA machos ( $P < 0,001$ ); PCNA hembras ( $P < 0,001$ ); **t-Student** (muerte hembras CTS vs CT y EP vs CT):  $P < 0,05$ ; \* estadísticamente significativo respecto grupo CT; # estadísticamente significativo respecto grupo EP; & estadísticamente significativo respecto grupo CTS.  $n=3/\text{grupo}$ .



---

---

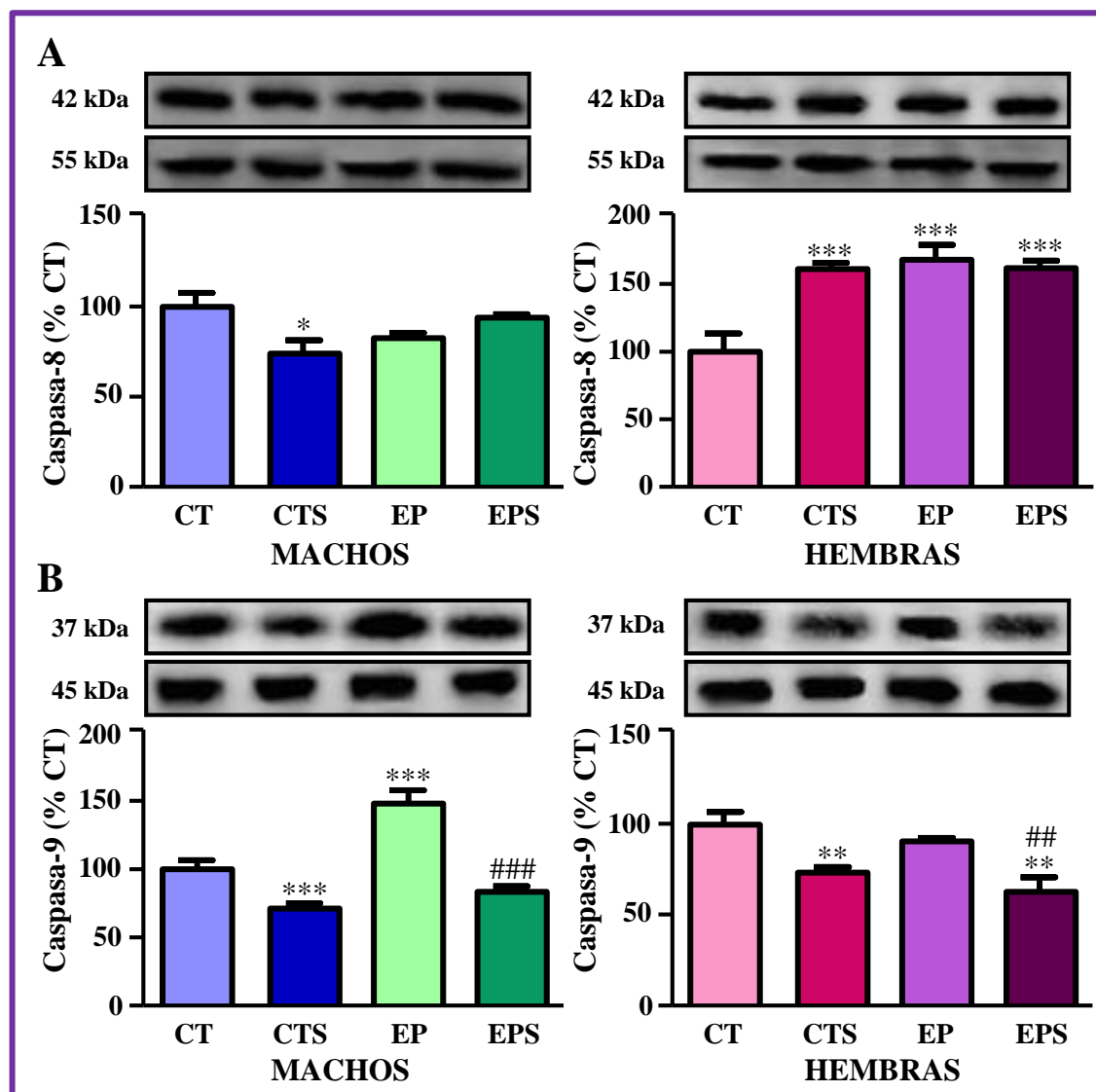
### **2.3.2.2. Efecto del estrés prenatal sobre las vías de muerte celular en el hipotálamo de ratones macho y hembra alimentados con una dieta rica en sacarosa introducida en la etapa adulta.**

#### **2.3.2.2.1. Niveles proteicos de caspasa-8.**

Los niveles de caspasa-8 en los machos no se vieron afectados ni por el estrés prenatal, ni por la ingesta de sacarosa, únicamente se observó una interacción entre ambos factores ( $F_{(1,8)}$ : 11,89;  $P<0,01$ ). Los machos CTS tenían disminuidos los niveles de caspasa-8 respecto al grupo CT, sin diferencias entre el resto de los grupos (Figura 42A izquierda). En las hembras, se observó un efecto de ambos factores (estrés  $F_{(1,8)}$ : 13,59;  $P<0,01$ ; sacarosa  $F_{(1,8)}$ : 8,68;  $P<0,05$ ) y una interacción entre ellos ( $F_{(1,8)}$ : 12,88;  $P<0,01$ ). En las hembras todos los grupos de animales en estudio tenían mayores niveles de caspasa-8 que las hembras del grupo CT, sin diferencias entre las EP y las EPS, teniendo así la ingesta de sacarosa un efecto diferencial entre los animales control y los estresados (Figura 42A derecha).

#### **2.3.2.2.2. Niveles proteicos de caspasa-9.**

Se observó un efecto del estrés prenatal ( $F_{(1,8)}$ : 19,94;  $P<0,01$ ) y de la ingesta de sacarosa ( $F_{(1,8)}$ : 48,07;  $P<0,0001$ ) sobre los niveles de caspasa-9 en el hipotálamo de los ratones macho, existiendo una interacción entre ambos factores ( $F_{(1,8)}$ : 7,04;  $P<0,05$ ). En las hembras, sin embargo, únicamente se observó efecto de la ingesta de sacarosa ( $F_{(1,8)}$ : 23,49;  $P<0,01$ ), sin existir interacción entre el estrés prenatal y la ingesta de sacarosa. Los niveles de caspasa-9 estaban incrementados en los machos EP y no se modificaron en las hembras del mismo grupo. Los ratones CTS y EPS, machos y hembras, tenían menores niveles de caspasa-9 que los ratones CT y EP (Figura 42B izquierda y derecha, respectivamente).



**Figura 42:** Niveles relativos de la proteína caspasa-8 fragmentada (**A**) y caspasa-9 fragmentada (**B**) en el hipotálamo de ratones macho y hembra procedentes de madres control y madres estresadas durante la gestación y alimentados durante las dos semanas anteriores al sacrificio con pienso y agua o con pienso y una solución de sacarosa al 33%. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  e.e.m normalizados respecto a los valores de los animales control. Se muestra un gel representativo. **ANOVA:** Caspasa-8 machos ( $P<0,05$ ); caspasa-8 hembras ( $P<0,001$ ); caspasa-9 machos ( $P<0,001$ ); caspasa-9 hembras ( $P<0,01$ ); \* estadísticamente significativo respecto grupo CT; # estadísticamente significativo respecto grupo EP.  $n=3/\text{grupo}$ .

### **2.3.2.3. Efecto del estrés prenatal sobre proteínas reguladoras de la apoptosis en el hipotálamo de ratones macho y hembra alimentados con una dieta rica en sacarosa introducida en la etapa adulta.**

#### **2.3.2.3.1. Niveles proteicos de Bcl-2.**

Los niveles de Bcl-2 en el hipotálamo de los ratones macho y hembra estaban afectados por el estrés prenatal (machos  $F_{(1,8)}$ : 9,55;  $P<0,05$ ; hembras  $F_{(1,8)}$ : 67,53;  $P<0,0001$ ), pero no por la ingesta de sacarosa, existiendo una interacción entre ambos factores (machos  $F_{(1,8)}$ : 13,0;  $P<0,01$ ; hembras  $F_{(1,8)}$ : 68,76;  $P<0,0001$ ). Los niveles de Bcl-2 en los machos estaban incrementados en todos los grupos respecto al grupo CT. La ingesta de sacarosa tuvo un efecto diferencial, ya que incrementó los niveles de Bcl-2 en los machos CTS y sin embargo, los disminuyó en los machos EPS respecto al grupo EP (Figura 43A). Los niveles de Bcl-2 no se modificaron en las hembras EP y la ingesta de sacarosa tuvo un efecto diferencial ya que las hembras CTS tenían menores niveles de Bcl-2 que las CT y, sin embargo, las EPS tenían mayores niveles de Bcl-2 que el resto de grupos (Figura 43D).

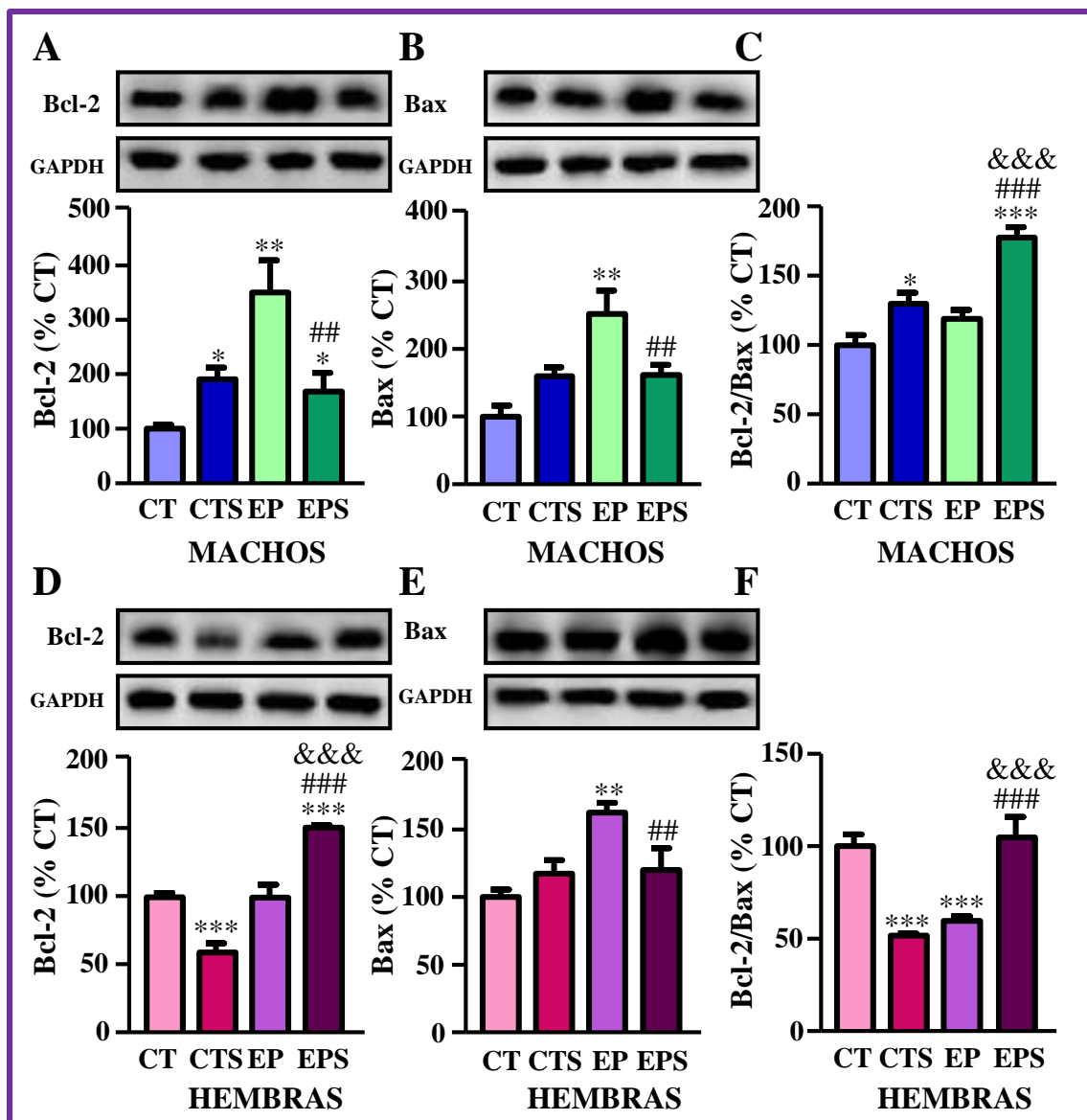
#### **2.3.2.3.2. Niveles proteicos de Bax.**

Los niveles de Bax en el hipotálamo estaban afectados por el estrés prenatal (machos Bax  $F_{(1,8)}$ : 10,36;  $P<0,01$ ; hembras Bax  $F_{(1,8)}$ : 9,70;  $P<0,01$ ), pero no por la ingesta de sacarosa, existiendo una interacción entre ambos factores (machos Bax  $F_{(1,8)}$ : 10,24;  $P<0,05$ ; hembras Bax  $F_{(1,8)}$ : 8,19;  $P<0,05$ ). Los niveles de Bax en los ratones macho EP estaban incrementados con respecto al grupo CT. La ingesta de sacarosa tuvo un efecto diferencial, ya que no modificó los niveles de Bax en los machos CTS y sin embargo, los disminuyó en los machos EPS respecto al grupo EP (Figura 43B). En las hembras, los niveles de Bax estaban incrementados en el grupo EP respecto al grupo CT. La ingesta de sacarosa no modificó los niveles de Bax en las hembras CTS y, sin embargo, los disminuyó en las EPS respecto a las EP (Figura 43E).

#### **2.3.2.3.3. Ratio Bcl-2/Bax.**

El ratio Bcl-2/Bax en los machos estaba afectado por el estrés prenatal ( $F_{(1,8)}$ : 18,01;  $P<0,01$ ) y por la ingesta de sacarosa ( $F_{(1,8)}$ : 31,68;  $P<0,001$ ), sin existir interacción entre ambos factores. El ratio Bcl-2/Bax estaba incrementado en los machos CTS y EPS, siendo este incremento más acusado y significativamente mayor en los machos EPS (Figura 43C). En las hembras, únicamente se observó una interacción entre el estrés prenatal y la ingesta

de sacarosa ( $F_{(1,8)}: 52,50; P<0,0001$ ) sobre el ratio Bcl-2/Bax. Dicho ratio disminuyó en las hembras EP y CTS, mientras que incrementó en las EPS con respecto a los grupos CTS y EP (Figura 43F).



**Figura 43:** Niveles relativos de la proteína Bcl-2 (A, D), Bax (B, E) y ratio Bcl-2/Bax (C, F) en el hipotálamo de ratones macho y hembra procedentes de madres control y madres estresadas durante la gestación y alimentados durante las dos semanas anteriores al sacrificio con pienso y agua o con pienso y una solución de sacarosa al 33%. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  e.e.m. normalizados respecto a los valores de los animales control. Se muestra un gel representativo. **ANOVA:** Bcl-2 machos ( $P<0,01$ ); Bcl-2 hembras ( $P<0,001$ ); Bax machos ( $P<0,01$ ); Bax hembras ( $P<0,01$ ); Bcl-2/Bax machos ( $P<0,001$ ); Bcl-2/Bax hembras ( $P<0,001$ ); **t-Student** (Bcl-2 machos CTS vs CT y EPS vs CT; Bcl-2/Bax machos CTS vs CT):  $P<0,05$ ; \* estadísticamente significativo respecto grupo CT; # estadísticamente significativo respecto grupo EP; & estadísticamente significativo respecto grupo CTS.  $n=3/\text{grupo}$ .

### 2.3.2.4. Efecto del estrés prenatal sobre GFAP y Tuj-1 en el hipotálamo de ratones macho y hembra alimentados con una dieta rica en sacarosa introducida en la etapa adulta.

#### 2.3.2.4.1. Niveles proteicos de GFAP.

Los niveles de GFAP se vieron afectados, tanto en machos como en hembras, por el estrés prenatal (machos  $F_{(1,8)}$ : 11,03;  $P<0,01$ ; hembras  $F_{(1,8)}$ : 7,58;  $P<0,05$ ), pero no por la ingesta de sacarosa, existiendo una interacción entre ambos factores (machos  $F_{(1,8)}$ : 11,12;  $P<0,01$ ; hembras  $F_{(1,8)}$ : 16,91;  $P<0,01$ ). Todos los grupos de machos tenían menores niveles de GFAP que los machos CT, sin diferencias entre los machos EP y EPS. No se observaron diferencias significativas entre las hembras estresadas (EP y EPS) y las hembras CT, sin embargo, las hembras CTS tenían mayores niveles de GFAP que las CT y las EPS.

#### 2.3.2.4.2. Niveles proteicos de Tuj-1.

En los niveles de Tuj-1, tanto de machos como de hembras, se observó un efecto del estrés prenatal (machos  $F_{(1,8)}$ : 16,96;  $P<0,01$ ; hembras  $F_{(1,8)}$ : 12,75;  $P<0,01$ ), de la ingesta de sacarosa (machos  $F_{(1,8)}$ : 6,54;  $P<0,05$ ; hembras  $F_{(1,8)}$ : 9,27;  $P<0,05$ ) y una interacción entre ambos factores (machos  $F_{(1,8)}$ : 9,44;  $P<0,05$ ; hembras  $F_{(1,8)}$ : 7,09;  $P<0,05$ ). Los niveles de Tuj-1 estaban disminuidos en los animales CTS, tanto machos como hembras. Los machos EP y EPS tenían niveles normales de Tuj-1, sin embargo, las hembras los tenían disminuidos (Tabla 8).

	HIPOTÁLAMO			
	CT	CTS	EP	EPS
<b>GFAP (machos)</b>	100,0 ± 4,8	82,8 ± 3,7*	73,0 ± 2,6**	82,9 ± 4,7*
<b>GFAP (hembras)</b>	100, ± 5,4	135,7 ± 10,5**	110,3 ± 8,6	83,7 ± 4,2&&
<b>Tuj-1 (machos)</b>	100,0 ± 5,5	77,9 ± 0,1***	104,1 ± 3,9	106,1 ± 4,0&&&
<b>Tuj-1 (hembras)</b>	100,0 ± 4,4	85,0 ± 1,1**	83,6 ± 0,1**	82,6 ± 2,6**

**Tabla 8:** Niveles relativos de la proteína GFAP y Tuj-1 en el hipotálamo de ratones macho y hembra procedentes de madres control y madres estresadas durante la gestación y alimentados durante las dos semanas anteriores al sacrificio con pienso y agua o con pienso y una solución de sacarosa al 33%. Los resultados se expresan como medias ± e.e.m. **ANOVA:** GFAP machos ( $P<0,001$ ); GFAP hembras ( $P<0,01$ ); Tuj-1 machos ( $P<0,001$ ); Tuj-1 hembras ( $P<0,01$ ); **t-Student** (GFAP machos CTS vs CT y EPS vs CT):  $P<0,05$ ; \* estadísticamente significativo respecto grupo CT; # estadísticamente significativo respecto grupo EP; & estadísticamente significativo respecto grupo CTS. n=3/grupo.



## **DISCUSIÓN**





## **DISCUSIÓN**

El ambiente intrauterino es crítico para el desarrollo fetal. La exposición a altos niveles de hormonas de estrés durante el desarrollo puede tener consecuencias a corto o a largo plazo sobre el metabolismo y el recambio celular de la descendencia, entre otras cosas (Barbazanges y cols., 1996; Brunson y cols., 2001; Maccari y cols., 2003; Tamashiro y cols., 2009).

Aunque se han empleado distintos modelos de estrés prenatal o estrés temprano (inmovilización, restricción de movimiento, suspensión o repetidos shocks) para estudiar las alteraciones de la función neuronal y el desarrollo de desórdenes del comportamiento (Ward y Weisz, 1980; Weinstock, 1997; Maccari y Morley-Fletcher, 2007), el estrés por restricción de movimiento es uno de los modelos de estrés más utilizados en roedores ya que es capaz de activar potentemente los dos componentes del sistema simpato-adrenal (Fernández y cols., 2000). Este tipo de estrés temprano es conocido por sus consecuencias comportamentales y neurobiológicas, simulando a su vez un modelo de depresión (Weinstock, 2001; Maccari y cols., 2003; Maccari y Morley-Fletcher, 2007; Darnaudéry y Maccari, 2008).

### **Efecto del estrés prenatal, así como de una dieta rica en sacarosa introducida en la etapa adulta sobre la respuesta metabólica en ratones macho y hembra**

El estrés prenatal disminuye el peso corporal de las hembras gestantes, sin modificar el número de embriones (Baker y cols., 2008; Lee y cols., 2008; Minagi y cols., 2009; Tamashiro y cols., 2009). En este estudio se observó dicha disminución en el día del sacrificio (día 17 de gestación), sin estar modificado el número de embriones. En cierta manera, este menor peso podría deberse a malnutrición o desnutrición durante el periodo de estrés, con consecuencias similares a los procesos de restricción del crecimiento intrauterino (Tamashiro y cols., 2009). Distintos procedimientos de estrés como pueden ser inmovilización (Minagi y cols., 2009; Gao y cols., 2011) o restricción de movimiento (Lesage y cols., 2004; Mairesse y cols., 2007; Lee y cols., 2008) dan lugar a embriones con menor peso corporal al nacimiento en rata y en ratón, aunque hay estudios que no están de acuerdo (D'Mello y Liu, 2006; Soberanes-Chávez, 2013). Estas diferencias podrían ser debidas a los diferentes modelos empleados, el tipo, la intensidad y el tiempo en el cual se llevó a cabo el estrés.

La restricción del crecimiento intrauterino y el bajo peso al nacimiento se ha asociado con el posterior desarrollo de hipertensión, resistencia a insulina y una composición corporal caracterizada por baja masa muscular y gran cantidad de tejido adiposo, cuadro característico del síndrome metabólico, en aquellos sujetos que no efectúan un crecimiento recuperador temprano (Barker, 2001; Bertram y Hanson, 2002; Bose y cols., 2009; Godfrey y cols., 2011; Breton, 2013). Además, se ha demostrado que tanto animales como humanos con bajo peso al nacimiento, en un breve periodo de tiempo pueden llegar a alcanzar un peso normal e incluso incrementar dicho peso de forma marcada hasta desarrollar obesidad (Godfrey y cols., 2011). En nuestro estudio se observó que los ratones macho estresados prenatalmente presentaban en el día del destete un mayor peso corporal que los machos control, sin diferencias entre las hembras. Posteriormente, a las 4 semanas de edad estas diferencias de peso entre los machos estresados y los controles desaparecieron y se mantuvieron de forma invariable hasta la semana 9 de vida, teniendo los machos un peso corporal mayor que las hembras. Estos datos están en concordancia con estudios previos del grupo realizados en ratas (García-Cáceres y cols., 2010a). De igual forma, Mueller y Bale, observaron que ratones estresados prenatalmente mediante un evento estresante diario distinto pesaban igual que los ratones control a las 10 semanas de edad, independientemente de que el estrés se hiciera en la primera, en la segunda o en la tercera semana de gestación (Mueller y Bale, 2006). Por tanto, el efecto inducido por el estrés prenatal sobre el peso corporal ocurre de manera temprana y se normaliza con el tiempo, de no ocurrir otra anomalía.

La diferenciación neuronal y la maduración del SNC tienen lugar en periodos tempranos de la vida del animal (Lucas, 1998; Tamashiro y cols., 2009) por lo que la presencia de estímulos estresantes en la madre generarán una respuesta fisiológica permanente que puede condicionar la respuesta a cambios metabólicos futuros como un cambio de dieta, lo que se conoce como programación fetal, dando lugar a un incremento en la susceptibilidad a otros condicionantes en el adulto (Bowman y cols., 2004; Tamashiro y cols., 2009). Por ello, se introdujo una dieta rica en sacarosa en la etapa adulta (semana 9 de edad) y se estudió el efecto sobre la ganancia de peso. La ingesta de sacarosa no tuvo ningún efecto sobre la ganancia de peso en machos; sin embargo, las hembras que bebieron sacarosa durante dos semanas (CTS y EPS) ganaron mayor cantidad de peso que las hembras que bebieron agua (CT y EP). Existe controversia en la literatura acerca del

efecto del consumo de sacarosa sobre la ganancia de peso corporal, ya que distintos estudios aseguran que el consumo de carbohidratos aumenta (Ludwig y cols., 2001; Raben y cols., 2002; Deaciuc y cols., 2008; Chepulis y Starkey, 2008; Lindqvist y cols., 2008; Alzamendi y cols., 2010; Couvreur y cols., 2011; Oliva y cols., 2011), disminuye (Lewis y cols., 1992; Hill y Prentice, 1995; Gibson, 1996; Cambri y cols., 2010; Fuente-Martín y cols., 2012a) o no modifica (Sclafani y cols., 1987; Soria y cols., 2001; Yanovski, 2003; Michael y Holzman, 2007; la Fleur y cols., 2010; Oliva y cols., 2011; Fuente-Martín y cols., 2012b; Sheludiakova y cols., 2012) el peso corporal. Esta controversia en los resultados podría deberse a las diferencias de especies, sexo, tipo de hidratos de carbono empleados, el momento en que se introdujo la dieta o el periodo de tiempo durante el cual el animal estuvo expuesto a dicha dieta.

Como ya observaron otros autores (Van der Borgh y cols., 2011; Fuente-Martín y cols., 2012b; Mela y cols., 2012) las hembras control que bebieron agua ingirieron menor cantidad de comida sólida y menor cantidad de kcal totales que los machos control que bebieron agua, sin cambios en la cantidad de líquido ingerido. El estrés prenatal per se no tuvo ningún efecto sobre la ingesta como ya se había descrito en otros trabajos (García-Cáceres y cols., 2010a; Lesage y cols., 2004); sin embargo, Lesage y cols demostraron que el estrés prenatal incrementa la ingesta después de un periodo de ayuno, sugiriendo una alteración del comportamiento alimentario durante situaciones de estrés (Lesage y cols., 2004).

La ingesta de sacarosa disminuyó la cantidad de comida ingerida, aumentó la cantidad de líquido bebido e incrementó la cantidad de kilocalorías totales consumidas, tanto en machos como en hembras. Estos resultados están en concordancia con experimentos llevados a cabo en ratas control alimentadas con sacarosa, glucosa o fructosa (Raben y cols., 2002; Lindqvist y cols., 2008; Alzamendi y cols., 2010; la Fleur y cols., 2010; Fuente-Martín y cols., 2012b; Oliva y cols., 2011; Sheludiakova y cols., 2012). Además, se observó que las hembras CTS ingieren mayor porcentaje de Kcal en forma de sacarosa que los machos CTS, lo que nos estaría sugiriendo que distintos factores como el sexo y el estado de las hormonas sexuales modulan el comportamiento alimenticio hedónico, en busca del placer (Sclafani y cols., 1987; Jezová y cols., 2002; Yanovski, 2003), teniendo las hembras una mayor preferencia por los alimentos dulces (Sclafani y cols., 1987; Jezová y cols., 2002; Yanovski, 2003; Michaels y Holtzman, 2007). Además,

estos resultados de ingesta podrían explicar la ganancia de peso corporal en las hembras, a mayor ingesta kilocalórica, mayor ganancia de peso. Sin embargo, los machos CTS a pesar de ingerir mayor cantidad de kilocalorías no ganaron peso respecto a los machos control, lo que nos podría estar indicando que existe algún tipo de mecanismo de compensación por el cual regulan la ingesta calórica mediante la disminución del consumo de pienso y posiblemente mediante un mayor gasto energético. Para afianzar estos datos se pesó la cantidad de tejido adiposo marrón, como indicador de la homeostasis energética y la termorregulación (Bale y cols., 2003; Pankevich y cols., 2009). En este caso, no hubo diferencias entre los animales estresados prenatalmente y los animales control. Estos datos estarían en concordancia con otros estudios realizados en el día 21 de vida (Tamashiro y cols., 2009). Algunos autores han observado que la ingesta de una dieta con un alto contenido en azúcares incrementa la cantidad de tejido adiposo marrón (Kanarek y cols., 1987; de Queiroz y cols., 2012). La ingesta de sacarosa incrementó la cantidad de tejido adiposo marrón sólo en los machos EP, sin modificarlos en los CT; es decir, el estrés prenatal está condicionando de alguna manera la respuesta de la sacarosa. En las hembras la ingesta de sacarosa no tuvo ningún efecto sobre el tejido adiposo marrón, aunque existía una tendencia a incrementar. Esto podría ser debido a que dos semanas de dieta rica en sacarosa no son suficientes para inducir un incremento en el peso de estos depósitos de manera significativa.

Además, para determinar si los ratones estresados prenatalmente incrementaban su gasto energético, se midieron los niveles de la proteína desacoplante 1 (UCP-1) en el tejido adiposo marrón como un indicador del proceso de regulación de la termogénesis (Bale y cols., 2003; Pankevich y cols., 2009; Harris y Apolzan, 2012). La falta de actividad de UCP-1 induce un incremento del índice de obesidad tanto en ratones jóvenes (Feldmann y cols., 2009), como en ratones viejos (Kontani y cols., 2005). El estrés prenatal no tuvo ningún efecto en los machos e incrementó los niveles de UCP-1 en ambos grupos de hembras estresadas. Estos datos están en concordancia con los observados por Pankevich y cols., (Pankevich y cols., 2009). Se ha descrito que una dieta con alta cantidad de azúcares incrementa los niveles de ARNm de UCP-1 en el tejido adiposo marrón de ratas (Kanarek y cols., 1987; de Queiroz y cols., 2012; Harris y Apolzan, 2012), así nuestros datos indican que el incremento de UCP-1 y por tanto, un incremento en el gasto energético podría ser el responsable de que los machos CTS no tengan una ganancia de peso mayor que los machos

CT, a pesar de consumir mayor cantidad de kilocalorías y tienen mayor cantidad de tejido adiposo subcutáneo y visceral. En hembras, sin embargo, la sacarosa no tuvo ningún efecto sobre los niveles de UCP-1 y por eso, las hembras CTS y EPS tienen una ganancia de peso mayor que las hembras CT y EP, lo que vendría acompañado de una ganancia de tejido adiposo subcutáneo y visceral inducido por una mayor ingesta kilocalórica y un gasto energético normal.

La distinta distribución en los depósitos de grasa entre machos y hembras, teniendo las hembras control mayor cantidad de tejido adiposo subcutáneo y menor cantidad de tejido adiposo visceral que los machos control (Gutin y cols., 2007; Shen y cols., 2009; Grove y cols., 2010), dará lugar a una expresión diferencial de proteínas involucradas en el control metabólico y por tanto, responderán de manera distinta frente a cambios metabólicos (Poussin y cols., 2008; Grove y cols., 2010) siendo el tejido adiposo visceral el más relacionado con problemas de salud inducidos por la obesidad (Montague y O’Rahilly, 2000; Bergman y cols., 2007). El estrés prenatal no modificó la cantidad de tejido adiposo, ni subcutáneo, ni visceral en ninguno de los dos sexos. Distintos autores han demostrado, tanto en machos como en hembras adultas, que el estrés prenatal no modifica la cantidad de grasa (Tamashiro y cols., 2009; Paternain y cols., 2012a). Sin embargo, la ingesta de sacarosa sí da lugar a cambios, ya que incrementó la cantidad de tejido adiposo subcutáneo únicamente en los machos control y la cantidad de tejido adiposo visceral tanto en los machos CTS como en los EPS. En las hembras, sin embargo, la ingesta de sacarosa incrementó la cantidad de tejido adiposo subcutáneo en el grupo EPS y de visceral en ambos grupos, CTS y EPS. Este incremento en la cantidad de tejido adiposo se ha visto en animales alimentados con sacarosa (Kim y cols., 1999; Rajkumar y cols., 1999; Soria y cols., 2001; Lomba y cols., 2009; Oliva y cols., 2011; Van der Borgh y cols., 2011; Fuente-Martín y cols., 2012a; Sheludiakova y cols., 2012) y con una dieta rica en grasa (Tamashiro y cols., 2009). Esto nos estaría indicando que la ingesta de sacarosa tiene un fuerte impacto sobre el tejido adiposo, en el caso de las hembras este incremento en la cantidad de tejido adiposo se reflejaría en el incremento de peso ganado y, sin embargo, en los machos, es posible que exista un mecanismo compensador, ya que, a pesar de tener mayor cantidad de tejido adiposo subcutáneo y visceral y de ingerir mayor cantidad de Kcal totales provenientes del pienso y de la sacarosa no sufren alteraciones del peso e incluso existe cierta tendencia a disminuir. Esto se explica por la reducción de la

masa muscular que sufren (Lomba y cols., 2009; Oliva y cols., 2011; Fuente-Martín y cols., 2012b; Sheludiakova y cols., 2012) y también por el mayor gasto energético relacionado con la ingesta de azúcares (Prinz y cols., 1980; Sheludiakova y cols., 2012).

En los animales estresados prenatalmente que bebieron sacarosa se observa un efecto de la sacarosa sobre los depósitos de tejido adiposo visceral, tanto en machos como en hembras, sin efecto del estrés, sin embargo, el estrés sí afecta a la cantidad de tejido adiposo subcutáneo, impidiendo su aumento en los machos e incrementándolo en las hembras. En otras palabras, el estrés estaría disminuyendo el efecto obesogénico de la dieta en los machos e incrementándolo en las hembras. Este efecto también fue observado en hembras estresadas prenatalmente y que posteriormente fueron alimentadas con una dieta rica en grasa y sacarosa (Paternain y cols., 2013).

Distintos estudios aseguran que la glucemia de los machos es mayor que la de las hembras (García-Cáceres y cols., 2010a; Fuente-Martín y cols., 2012b). No obstante, en nuestro estudio esta diferencia entre machos y hembras no llegó a ser significativa. El estrés prenatal no tuvo ningún efecto sobre los niveles séricos de glucosa como ya demostraron otros autores (Pankevich y cols., 2009; Tamashiro y cols., 2009; García-Cáceres y cols., 2010a). Hay estudios que sugieren que las alteraciones metabólicas de este modelo tienen lugar más a largo plazo (Lesage y cols., 2004). La ingesta de sacarosa tampoco tuvo ningún efecto sobre los niveles de glucosa en sangre ni en machos, ni en hembras como previamente se había descrito (Chepulis y Starkey, 2008; Lomba y cols., 2009; Huang y cols., 2010; Van der Borght y cols., 2011; Fuente-Martín y cols., 2012b; Sheludiakova y cols., 2012). Sin embargo, otros autores han demostrado que la ingesta de sacarosa durante un largo periodo de tiempo o una mayor concentración de sacarosa incrementa la glucemia (Deaciuc y cols., 2008; Macan y cols., 2010; Oliva y cols., 2011). Esto podría ser debido a que los animales no estaban en ayunas en el momento del sacrificio o bien al tipo de dieta.

La ingesta está regulada por diferentes factores, entre ellos tiene una función destacada la leptina como péptido anorexigénico (Perello y Spinedi, 2004; Proulx y Seeley, 2005). Las modificaciones observadas en la cantidad de tejido adiposo tanto subcutáneo como visceral podrían llevar a cambios en los niveles séricos de leptina. Las hembras de ratón tienen menores niveles de leptina que los machos (Mueller y Bale, 2006; Mela y

cols., 2012). El estrés prenatal per se no tuvo ningún efecto sobre los niveles de leptina ni en machos, ni en hembras y esto ocurre tanto en roedores jóvenes, como en adultos (Tamashiro y cols., 2009; Mueller y Bale, 2006). La ingesta de sacarosa no modificó los niveles de leptina en los machos CTS, sin embargo, los machos que bebieron sacarosa y previamente habían sido estresados presentaban un incremento. En las hembras, la ingesta de sacarosa no indujo ningún efecto sobre los niveles de leptina, aunque en ambos grupos de hembras que bebieron sacarosa existía una tendencia a incrementar. Este incremento aunque no es estadísticamente significativo en las hembras podría ser debido, al menos en parte, al incremento en la cantidad de tejido adiposo subcutáneo. La ingesta de sacarosa normalmente incrementa los niveles de leptina cuando los animales se encuentran en ayunas (Lindqvist y cols. 2008; Van der Borgh y cols., 2011; Fuente-Martín y cols., 2012a); sin embargo, cuando los animales no están en ayunas como es el caso de este estudio, la ingesta de sacarosa no los modifica (Fuente-Martín y cols., 2012b). Además, la duración de la dieta puede también influir puesto que se ha descrito incremento en leptina tras 5 semanas de dieta (la Fleur y cols., 2010).

Los niveles de insulina también son susceptibles de ser modulados tanto por estrés como por la ingesta de sacarosa y, además, la insulina al igual que la leptina está implicada en el control de la ingesta. Las hembras tienen menores niveles circulantes de insulina que los machos (Fuente-Martín y cols., 2012b; Mela y cols., 2012). El estrés prenatal disminuye los niveles de insulina tanto en machos como en hembras (Snoeck y cols., 1990; Lesage y cols., 2004; Luo y cols., 2010; Paternain y cols., 2013). No obstante, otros autores no observan diferencias en los niveles de insulina entre los machos control y los estresados ni en embriones de 21 días (Mairesse y cols., 2007), ni en los primeros días postnatales (Tamashiro y cols., 2009). Estas diferencias podrían deberse a la edad de los animales en el momento del estudio o al diferente estímulo estresante llevado a cabo.

Es posible que nuestro modelo genere alguna alteración en el desarrollo del páncreas, ya que el periodo en el que se está llevando a cabo el estrés es el principal periodo para la formación de los distintos órganos (Lee y cols., 2008). Por otra parte, Blondeau y cols., demostraron que la sobreexposición a glucocorticoides maternos producía una disminución del número de islotes pancreáticos y de la cantidad de células  $\beta$  (Blondeau y cols., 2001). Asimismo, otros autores también han demostrado que el estrés prenatal y la desnutrición materna reducen el peso del páncreas y éste está asociado con un

descenso significativo de la masa de células  $\beta$  del páncreas (Mairesse y cols., 2007; Martin-Gronert y Ozanne, 2012), lo que podría conducir a una disminución de la síntesis de insulina, indicándonos una sensibilidad incrementada a la misma (Martin-Gronert y Ozanne, 2012).

En nuestro estudio, los animales, tanto machos como hembras, que bebieron sacarosa disminuyeron los niveles séricos de insulina. Estudios similares demuestran que la ingesta de sacarosa no tuvo ningún efecto sobre los niveles de insulina (Huang y cols., 2010; Fuente-Martín y cols., 2012b). Sin embargo, en estudios donde la ingesta de sacarosa se produjo en periodos de tiempo más prolongados sí se ha observado un incremento de los niveles de insulina, produciéndose un cierto grado de resistencia a la acción de ésta (Deaciuc y cols., 2008; la Fleur y cols., 2010; Sánchez-Lozada y cols., 2010; Roncal-Jiménez y cols., 2011), aunque tras 16 semanas la insulina desciende por debajo de los valores control (Roncal-Jiménez y cols., 2011). La combinación de estrés prenatal y la ingesta de sacarosa indujo en las hembras una disminución de los niveles de insulina mayor a la producida por cada uno de los estímulos.

El estudio de diferentes tipos de perturbaciones intrauterinas ha permitido establecer que los factores de crecimiento tipo insulina (IGF-I) tienen un importante papel en el desarrollo, el crecimiento placentar y embrionario y en la regulación del balance energético en la descendencia a largo plazo (Vickers y cols., 2001; Fowden, 2003; Fowden y cols., 2006; Forbes y Westwood, 2008; Pankevich y cols., 2009) y que los niveles de IGF-I están altamente regulados en el feto por factores nutricionales (Fowden, 2003; Oliver y cols., 1993). En nuestro estudio el estrés prenatal disminuyó los niveles séricos de IGF-I tanto en machos como en hembras.

Existen datos que indican que el estrés materno por inmovilización durante la lactancia induce malnutrición materna y un descenso de los niveles de IGF-I tanto en la madre como en la descendencia (Gao y cols., 2011). Además, la disminución de los niveles de IGF-I observada en nuestro estudio podría deberse a una alteración en la maduración del hígado, ya que un evento estresante durante el estado embrionario podría inducir una malformación o alteración en la maduración de los distintos órganos (Reinisch et al. 1978, Novy & Walsh 1983; Lesage y cols., 2004; Godfrey y cols., 2011).

La ingesta de sacarosa tuvo un efecto diferencial entre los grupos CT y EP, ya que disminuyen los niveles de IGF-I en los ratones CTS, tanto en machos como en hembras y,



sin embargo, en los animales estresados la ingesta de sacarosa produjo un incremento de los niveles de IGF-I en machos y no los modificó en hembras. La ingesta de una gran cantidad de hidratos de carbono durante un periodo prolongado de tiempo induce esteatosis hepática, fibrosis hepática o hígado graso (Deaciuc y cols, 2008; Huang y cols., 2010; Sánchez-Lozada y cols., 2010; Roncal-Jiménez y cols., 2012) con bajos niveles de IGF-I circulantes (Arturi y cols., 2011). En nuestro caso es poco probable que los efectos de la sacarosa sobre los niveles de IGF-I sean debidos a esta enfermedad, ya que la dieta solamente duró 2 semanas, pero no se puede descartar que el hígado esté sufriendo algún tipo de proceso y por tanto, no esté secretando la cantidad adecuada de IGF-I. Distintos grados de malnutrición producen una disminución de los niveles séricos de GH, IGF-I y de IGFBP-3, tanto en roedores como en humanos (VandeHaar y cols., 1991; Thissen y cols., 1994; Oster y cols., 1995; Smith y cols., 1995; Lewis y cols., 1997, Lewis y cols., 2003). Los animales que bebieron sacarosa comían menor cantidad de pienso que los animales que bebieron agua y, por tanto, esa menor ingesta de pienso induciría una menor ingesta de proteínas y de otros nutrientes básicos que podría estar relacionada con una disminución en la secreción de IGF-I.

El estrés prenatal induce un incremento en los niveles séricos de hormona adrenocorticotropa y corticosterona a largo plazo (Fride y cols., 1986; Takahashi y Kalin, 1991; Henry y cols., 1994; McCormick y cols., 1995; Weinstock, 1997; Koehl y cols., 1999; Bertram y Hanson, 2002; Vanitallie, 2002; D'Mello y cols., 2006; Mairesse y cols., 2007), siendo este efecto sexo dimórfico (Weinstock y cols., 1992; McCormick y cols., 1995; Jezová y col., 2002). Sin embargo, este efecto no es del todo claro, ya que, otros estudios aseguran que el estrés prenatal incrementa los niveles de ACTH y corticosterona en hembras, sin verse afectados en los machos (Weinstock y cols., 1992; McCormick y cols., 1995; Jezová y col., 2002) o que dichos niveles no se ven modificados en ninguno de los dos sexos (García-Cáceres y cols., 2010b). En nuestro estudio se observó que el estrés prenatal no modificó los niveles séricos de corticosterona en los machos y los incrementó en las hembras.

La ingesta de sacarosa podría ser considerada como un estímulo estresante, ya que, los animales no disponían de agua para beber, únicamente disponían de la solución de sacarosa, sin embargo, en nuestro estudio la ingesta de sacarosa no tuvo ningún efecto sobre los niveles de corticosterona, ni en machos, ni en hembras, al igual que ocurre en

dietas de sacarosa, glucosa o fructosa durante 4 semanas donde no se modifican los niveles de corticosterona en machos (Van der Borgh y cols., 2011), o con una dieta rica en grasa y sacarosa donde no se modifican en hembras (Paternain y cols., 2012b). Distintos estudios muestran como dependiendo de la especie animal empleada en el estudio, de la edad del animal en la que se introduzca la dieta rica en sacarosa y de la duración de dicha dieta los resultados pueden ser distintos. Así, la ingesta de sacarosa durante dos semanas introducida en ratas en la edad adulta disminuyó los niveles de corticosterona pudiendo ser esto consecuencia de los efectos placenteros del azúcar y sin embargo, las ratas expuestas a una dieta rica en sacarosa desde el momento del destete no presentaron cambios en estos niveles (Fuente-Martín y cols., 2012a). Los datos obtenidos en este estudio nos estarían indicando que la dieta rica en sacarosa no es estresante.

Los glucocorticoides tienen un efecto estimulador de la expresión y secreción de leptina (Grasa, 2004; Perello y Spinedi, 2004; Spencer, 2013) e interactúan con la acción y secreción de la insulina, estimulándola (Dallman y cols., 1995; Nieuwenhuizen y Rutters, 2008), lo que contribuye a un incremento de la adiposidad. La ausencia de glucocorticoides se ha relacionado con una reducción en las concentraciones plasmáticas de leptina e insulina (Proulx y Seeley, 2005). En este estudio se observó que los animales control que bebieron sacarosa tenían mayor cantidad de tejido adiposo subcutáneo y visceral, una tendencia a tener mayores niveles de leptina y menores niveles de insulina, sin cambios en los niveles de corticosterona. Por tanto, estos datos parecen indicar que los efectos de la sacarosa son independientes de los glucocorticoides.

La malnutrición materna durante la gestación programa el metabolismo lipídico de manera que los hijos de mujeres malnutridas durante la gestación tienen menores niveles de HDL y mayores niveles de LDL y colesterol total (Roseboom y cols., 2000). Además, los efectos derivados de la programación prenatal se ven no sólo en la primera generación, sino también en posteriores (Buchwald y cols., 2012). En nuestro modelo experimental únicamente observamos que las hembras estresadas prenatalmente tenían menores niveles de C-T y tanto hembras como machos estresados tenían disminuidos los niveles HDL-c y LDL-c. Estos resultados podrían deberse a los bajos niveles de insulina circulante de los animales estresados prenatalmente, ya que se ha visto que la insulina es esencial para la regulación fisiológica del metabolismo de lipoproteínas (Romon y cols., 1983; Fossati y Romon-Rousseaux, 1987). Por otro lado, se ha observado que el tratamiento con

dexametasona incrementa los niveles de C-T, LDL-c, VLDL-c y TG, así como de los índices C-T/HDL-c, LDL-c/HDL-c y TG/HDL-c y reduce los niveles de HDL-c, induciendo alteraciones cardiometabólicas (Pinheiro y cols., 2009; Buchwald y cols., 2012). En nuestro estudio si calculamos estos índices observamos que los animales estresados prenatalmente, tanto machos como hembras los tienen incrementados. Por tanto, nuestros datos parecen indicar que el estrés generado en la madre podría inducir problemas cardiometabólicos en la descendencia.

La ingesta de sacarosa no modificó los niveles séricos de triglicéridos, colesterol total, HDL-c y LDL-c, proteínas totales, glicerol y lípidos totales en los animales control y esto se ha descrito utilizando distintos tipos de dietas (Chepulis y Starkey, 2008; Macan y cols., 2010; Fuente-Martín y cols., 2012a; Paternain y cols., 2012b). Sin embargo, la ingesta de sacarosa en los animales que habían sido estresados previamente (grupo EPS) indujo un incremento de los niveles de colesterol total en las hembras y de HDL y LDL en ambos sexos con respecto a los ratones EP, restaurando dichos niveles a valores control. Por tanto, podríamos decir que la ingesta de sacarosa revierte el efecto del estrés prenatal.

Los neuropéptidos orexigénicos (NPY y AgRP) y los anorexigénicos (POMC y CART) están implicados en la regulación de la homeostasis energética (Terroni y cols., 2005). Al estudiar cómo se modificaban estos péptidos en nuestro estudio, observamos que el estrés prenatal disminuyó los niveles de ARNm de POMC en las hembras, mientras que en los machos estresados prenatalmente estos niveles no se vieron modificados. Esto estaría en consonancia con los resultados obtenidos por Weinstock y cols. (Weinstock y cols., 1992). Los niveles de NPY, sin embargo, se encuentran incrementados en los machos EP y disminuidos en las hembras EP. El incremento de los niveles de NPY en los machos pudiera deberse a un aumento de los niveles circulantes de corticosterona que potencian las acciones orexigénicas del NPY en el núcleo arcuato del hipotálamo (Strack y cols., 1995; Dallman y cols., 1995; Perello y Spinedi, 2004; Kuo y cols., 2007; Nieuwenhuizen y Rutters, 2008; Uchoa y cols., 2012; Spencer, 2013), aunque en el momento del sacrificio dichos niveles ya se hayan restaurado. En las hembras, el incremento de los niveles circulantes de corticosterona podría estar induciendo un incremento en la expresión de CRH hipotalámico dando lugar así a una disminución de los niveles de NPY dado que tiene acciones inversas a los glucocorticoides (Nieuwenhuizen y Rutters, 2008). El estrés condiciona el efecto de la ingesta de sacarosa sobre los niveles de los neuropéptidos ya

que, en machos EPS la ingesta de sacarosa disminuyó los niveles de NPY y aumentó los de POMC y sin embargo, en los machos CTS la ingesta de sacarosa no modificó los niveles de NPY y aumentó los de POMC, pero de forma más acusada que en los machos EPS. En las hembras sin embargo, la ingesta de sacarosa disminuyó tanto los niveles de NPY como los de POMC en los animales CTS y EPS. Esta disminución de los niveles de NPY y POMC en hembras se ha visto en experimentos realizados en ratas hembra en los cuales se les administraba sacarosa durante dos semanas, aunque también se observaba el mismo efecto si las ratas bebían una solución de glucosa o de fructosa (Lindquist y cols., 2008).

La actividad hipotalámica de NPY está incrementada en ratas y ratones que son susceptibles a obesidad inducida por la dieta (Wilding y cols., 1992; Levin y Dunn-Meynell, 1997; Huang y cols., 2003), sin embargo, el consumo de una dieta con un alto contenido en grasa y/o sacarosa a menudo, aunque no siempre, resulta en un descenso de los niveles de ARNm de NPY y un incremento de los niveles de ARNm de POMC para contrarrestar la obesidad (Lin y cols., 2000; Ziotopoulou y cols., 2000; Archer y Mercer, 2007; Dziedzic y cols., 2007; Paternain y cols., 2012a). Por otro lado, se ha visto que los niveles de NPY son menores en las ratas alimentadas durante dos semanas con dieta normal y una solución de sacarosa ad libitum cuando las concentraciones de leptina están incrementadas (Lindqvist y cols. 2008). En nuestro caso es probable que la ingesta de sacarosa en machos esté incrementando los niveles de POMC para contrarrestar la obesidad, por ello, a pesar de que los animales de este estudio comían mayor cantidad de kilocalorías y tenían mayor cantidad de tejido adiposo subcutáneo y visceral, no incrementaban la ganancia de peso. No debemos olvidar que no solamente el hipotálamo se encarga de la regulación de la ingesta, sino que también otras partes del SNC como son la amígdala y el tracto del núcleo solitario también participan en dicha regulación (Lindqvist y cols., 2008). Además, otros péptidos como son la grelina, la leptina, la insulina y el péptido YY, entre otros, también están implicados en la regulación de la ingesta (Lindqvist y cols., 2008). Tanto la leptina como la insulina activan las neuronas POMC/CART e inhiben las neuronas orexigénicas NPY/AgRP, disminuyendo así la ingesta (Schwartz y cols., 2000; Lesage y cols., 2004; Perello y Spinedi, 2004; Proulx y Seeley, 2005; Nieuwenhuizen y Rutters, 2008). En nuestro caso las modificaciones en los neuropéptidos y por tanto, de la ingesta no parecen estar reguladas por la leptina en las hembras, ni en los machos CTS y EP, ya que los niveles de leptina no se vieron modificados. Sin embargo, en

los machos EPS, la leptina sí podría estar regulando la ingesta, ya que ese grupo tiene incrementados los niveles de leptina, y ésta podría estar incrementando los niveles de POMC e inhibiendo los de NPY. Por el contrario, en las hembras la expresión de POMC podría estar influida por los niveles de insulina, ya que, todas las hembras tenían menores niveles de insulina que las hembras control y menores niveles de insulina darían lugar a menores niveles de POMC.

Cuando se analiza qué ocurre durante el desarrollo, en los embriones de 17 días se observó que los ratones macho estresados tenían incrementados los niveles de NPY y POMC, sin cambios en AgRP y CART. Esto también se ha descrito en fetos estresados prenatalmente con una dieta pobre en proteínas (Terroni y cols., 2005). El incremento de NPY en los ratones EP podría ser debido a un aumento de los niveles de glucocorticoides, ya que, como se ha visto anteriormente los glucocorticoides son capaces de incrementar los niveles hipotalámicos de NPY (Strack y cols., 1995; Dallman y cols., 1995; Perello y Spinedi, 2004; Kuo y cols., 2007; Nieuwenhuizen y Rutters, 2008; Uchoa y cols., 2012; Spencer, 2013). Las hembras estresadas, por el contrario, tenían menores niveles de ambos péptidos anorexigénicos (POMC y CART), sin cambios entre los orexigénicos (NPY y AgRP). Esto podría deberse a que los embriones procedentes de madres estresadas podrían estar recibiendo un menor aporte de nutrientes, ya que las hembras gestantes al sacrificio pesan menos probablemente debido a que ingieren menor cantidad de comida, y por tanto, deberían estar incrementados los neuropéptidos orexigénicos o disminuidos los anorexigénicos. Sin embargo, estos neuropéptidos en edad embrionaria más que estar implicados en la regulación de la homeostasis energética, están implicados en otras funciones. NPY en el cerebro fetal está implicado en neurogénesis, ya que, es un factor proliferativo tanto de células precursoras hipocampales como de neuroblastos *in vitro* (Howell y cols., 2003; Terroni y cols., 2005). POMC tiene un papel importante en la regulación de la proliferación celular y la diferenciación neuronal (Angelogianni y cols., 2000; Terroni y cols., 2005). Por tanto, en nuestro caso los neuropéptidos nos podrían estar indicando el grado de desarrollo de las neuronas. Cuando se comparan machos con hembras se observa que las hembras control tienen menores niveles de AgRP y mayores de CART que los machos control. Esto podría ser explicado por los niveles de testosterona, ya que la testosterona estimula la actividad de las hormonas orexigénicas NPY/AgRP e inhibe la de las anorexigénicas POMC/CART en el núcleo arcuato del hipotálamo (Hirschber,

2012). Los niveles de testosterona son más altos en los machos que en las hembras a diferentes días embrionarios (Turkelson y cols., 1977; Weisz y Ward, 1980).

En conclusión, todos los resultados analizados en este trabajo nos indican que para hacer una correcta interpretación de los datos en estudios de la función metabólica es preciso tener en cuenta numerosos factores tales como el sexo, la edad y el estatus nutricional o ambiental temprano de los individuos. Por otro lado, debemos destacar que en este trabajo se está estudiando el efecto del estrés prenatal en ratones adultos jóvenes y no se puede excluir la posibilidad de que los desórdenes metabólicos ocurran más lentamente o sean emergentes en la vida adulta.

### **Efecto del estrés prenatal, así como de una dieta rica en sacarosa introducida en la etapa adulta sobre el recambio celular**

El cerebro está claramente afectado por la nutrición durante la gestación como demuestran distintos estudios en los que se ha medido el neuropéptido Y en embriones procedentes de madres diabéticas o de madres sometidas a una dieta baja en proteínas durante la gestación (Singh y cols., 1997; Terroni y cols., 2005) y otros trabajos en los que se ha estudiado el crecimiento del cerebro y la formación de nuevas células en la descendencia de madres malnutridas (Debassio y cols., 1994; Gressens y cols., 1997; Plagemann y cols., 2000).

La exposición a estrés durante el desarrollo del cerebro incrementa la vulnerabilidad del individuo frente a desórdenes mentales (Maccari y Morley-Fletcher, 2007). El estrés materno induce cambios en el ambiente proliferativo y en la supervivencia celular en el hipocampo (Thomas y cols., 2007; Mandyam y cols., 2008) y estos cambios podrían dar lugar a alteraciones en la sensibilidad tanto a cambios fisiológicos como patofisiológicos futuros, por ejemplo, modificando la respuesta frente a cambios metabólicos, como pudiera ser un cambio de dieta en la edad adulta. Por ello, en esta segunda parte del trabajo se estudió el efecto del estrés prenatal sobre la muerte celular, la proliferación y las proteínas implicadas en los mecanismos de regulación de los procesos de muerte celular en el eje hipocampo-hipotálamo-hipofisario en ratas macho adultas y en el hipocampo y el hipotálamo de embriones de 17 días y de ratones adultos. Además, se estudió el efecto de una dieta rica en sacarosa sobre el recambio celular en ratones macho y hembra.

*Efecto del estrés prenatal sobre el recambio celular en el eje hipocampo-hipotálamo-hipofisario*

Algunos estudios muestran un incremento en la muerte celular en neuronas del núcleo paraventricular del hipotálamo en ratas fetales (Fujioka y cols., 1999; Tobe y cols., 2005), sin embargo, otros estudios realizados en ratas adultas muestran una reducción en la proliferación del hipocampo en respuesta a estrés prenatal por restricción de movimiento y éste efecto no está acompañado por un incremento en picnosis (Lemaire y cols., 2000; Seckl, 2001), sugiriendo que el estrés debe inducir un mayor efecto en células inmaduras, que son más susceptibles a muerte celular antes de establecer las conexiones firmes (Levine, 2002; Zhang y cols., 2002). En nuestro trabajo se observó que el estrés prenatal redujo el ratio de proliferación e inhibió la muerte celular en el eje HHH de ratas macho adultas a través de la inhibición de la vía extrínseca de apoptosis. Sin embargo, en ratones adultos el estrés prenatal no modificó los niveles de muerte celular, ni de proliferación en el hipocampo de los machos y los disminuyó en el de las hembras con inhibición tanto de la ruta extrínseca como de la intrínseca. En el hipotálamo, tanto de machos como de hembras, el estrés prenatal incrementó los niveles de muerte celular con activación de la vía intrínseca en los machos y de la vía extrínseca en las hembras, mientras que la proliferación únicamente estaba incrementada en los ratones machos EP y no en las hembras. Durante el desarrollo, en los embriones E17 de ratón se observó que el estrés prenatal incrementó los niveles de muerte celular en el hipocampo de machos y hembras por activación tanto de la vía extrínseca como intrínseca, aunque en el hipotálamo disminuyó la muerte celular mediada por inhibición de la vía extrínseca en los machos y no los modificó en las hembras. La proliferación estaba únicamente incrementada en el hipocampo de los embriones macho E17. Como consecuencia de estos cambios en estado embrionario, y por ende, en las poblaciones celulares del hipocampo y del hipotálamo se podrían producir cambios a largo plazo relacionados con la hipótesis de la “cascada de glucocorticoides”, que propone que una experiencia estresante es responsable de las alteraciones en la estructura y función de la formación hipocampal a través de una excesiva liberación de corticosterona (Sapolsky, 1996; Tottenham y Sheridan, 2010). Sin embargo, este efecto no es probable que sea debido sólo a la exposición prenatal a corticosterona, ya que todas las ratas presentaban niveles similares de corticosterona en el momento del sacrificio (García-Cáceres y cols., 2010b) y no existía efecto del estrés prenatal sobre el

peso de las glándulas adrenales, sin embargo, en los ratones adultos sí existía un incremento de corticosterona en las hembras estresadas prenatalmente, pero no en los machos.

Además se estudió la ruta de las calpaínas, cisteín proteasas dependientes de calcio también implicadas en procesos apoptóticos (Ray y cols, 2000; Das y cols., 2008) especialmente en aquellos que implican un incremento en las concentraciones de calcio intracelular (Kar y cols., 2010). Las calpaínas juegan un papel importante en muerte celular apoptótica a través de interacciones directas o indirectas con miembros de la familia de proteasas caspasas (Kar y cols., 2010) y actúan como reguladores de las caspasas (Vaisid y cols., 2009), siendo muchos sustratos de las calpaínas similares o sus funciones iguales a los de las caspasas (Barbazanges y cols., 1996; Li y cols., 2009). Por tanto, las calpaínas y las caspasas pueden activar las mismas proteínas, aunque en sitios de activación diferentes. En nuestro estudio se observó una disminución de calpaína-2 en las ratas estresadas prenatalmente en las tres áreas. Los niveles de calpaínas también están regulados por la existencia de un inhibidor endógeno, la calpastatina, que ejerce acciones neuroprotectoras (Ray y cols., 2000; Wingrave y cols., 2004; Kar y cols., 2010). Así, se observó un aumento de los niveles de calpastatina que podría explicar el descenso en los niveles de calpaína-2 y en los niveles de muerte celular.

Múltiples proteínas y factores de transcripción se encargan de regular el proceso de apoptosis, entre ellos destacan los miembros pro- y anti-apoptóticos de la superfamilia de Bcl-2 localizados en la membrana mitocondrial (Almeida y cols., 2000; Noguchi y cols., 2008). El incremento de los niveles de apoptosis se corresponden con un incremento del ratio Bax/Bcl-2 y Bax/Bcl-x(L) (Almeida y cols., 2000). El estrés prenatal incrementó Bcl-2 en las ratas adultas y en el hipocampo y el hipotálamo de los ratones macho adultos y de los machos E17 y disminuyó Bax en el hipocampo y el hipotálamo de ratas macho adultas, en el hipocampo de las hembras adultas y en el hipotálamo de los machos E17, e incrementó Bax en el hipocampo y el hipotálamo de los machos adultos, en el hipotálamo de las hembras adultas y en el hipocampo de machos y hembras E17. Para una mejor comprensión del balance apoptótico se calculó el ratio Bcl-2/Bax, observándose un incremento de dicho ratio en el eje HHH de las ratas macho adultas, en el hipocampo de los ratones adultos de ambos sexos y en el hipotálamo de los machos E17 y una disminución en el hipotálamo de las hembras adultas y en el hipocampo de las hembras



E17. La sobre-expresión de Bcl-2 induce una disminución de la expresión y actividad de las caspasas (Miao y cols., 2007). Algunos modelos de iniciación de la apoptosis proponen que la liberación de componentes mitocondriales de la cascada apoptótica es el resultado de la apertura de megacanales en la membrana mitocondrial interna facilitado por la unión de factores pro-apoptóticos como Bax (Murphy y cols., 2001). La sobre-expresión de Bcl-2 proporciona un mecanismo que inhibe la apertura de estos canales con un incremento en el volumen mitocondrial y en la capacidad de la mitocondria para acumular calcio en su interior haciendo a la célula más resistente al daño respiratorio inducido por calcio (Murphy y cols., 2001; Hajnóczky y cols., 2003). En situaciones prolongadas de incremento de calcio se produce un aumento de la expresión de calpastatina y de su capacidad inhibitoria. Por lo tanto, la formación del complejo calpaína-calpastatina junto con un aumento de la síntesis de calpastatina debe representar una respuesta celular de defensa frente a una situación prolongada de alteración de la homeostasis intracelular del calcio (Stifanese y cols., 2010).

Otro de los factores reguladores es la proteína supresora de tumores p53 que se activa en respuesta a un estrés celular dando lugar a la parada del ciclo celular y muerte celular por apoptosis. La muerte celular inducida por p53 conlleva la activación de caspasas mediante la liberación de factores apoptogénicos de la mitocondria. Este proceso está regulado por las proteínas de la familia Bcl-2 (Schuler y Green, 2001; Haupt y cols., 2003; Hamada y cols., 2009). En nuestro estudio, los niveles de fosforilación de p53 se encontraban disminuidos en las ratas estresadas prenatalmente, tanto en el hipocampo como en la hipófisis, pero no tuvo efecto en el hipotálamo. Por tanto, la inhibición de p53 observada podría deberse al incremento de los niveles de Bcl-2 en estas áreas.

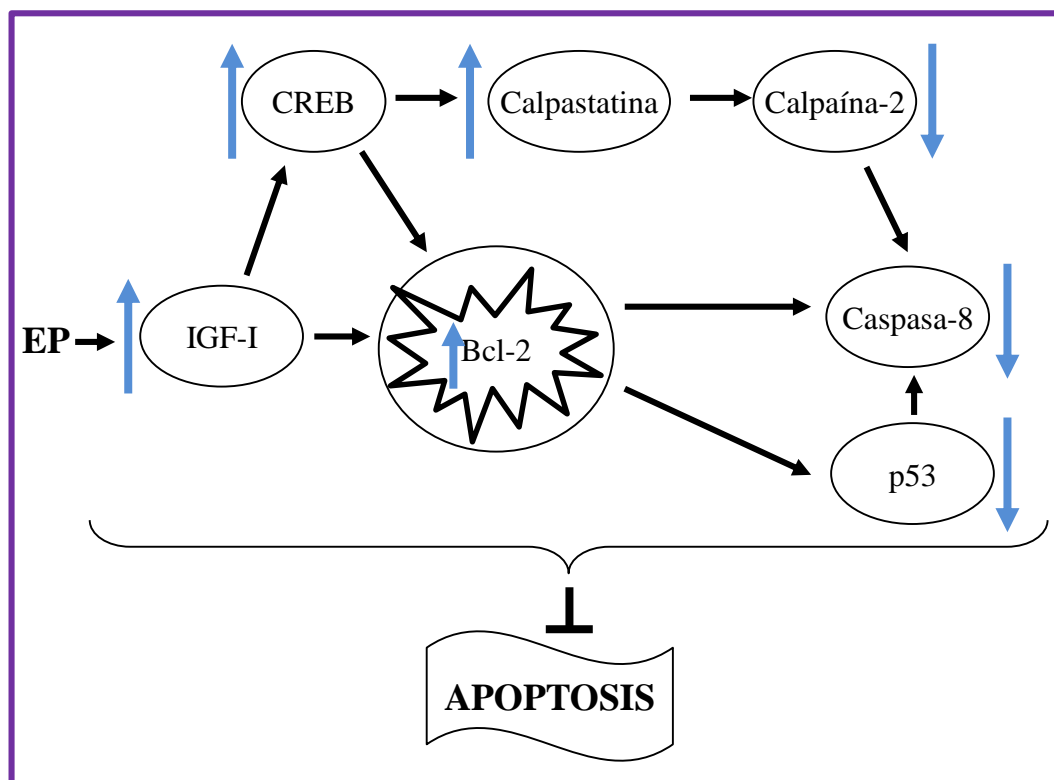
Se ha sugerido que hay factores implicados en proteger al cerebro después de ser sometido a algún tipo de estímulo estresante entre los que se encontraría la fosforilación del factor de transcripción CREB (Kwon y cols., 2006; 2007). CREB es un factor implicado en diversas funciones como son plasticidad sináptica, homeostasis de la glucosa, supervivencia celular dependiente de factores de crecimiento, aprendizaje y memoria (Mayr y Montminy, 2001; Kwon y cols., 2006; 2007). Además las regiones promotoras de los genes de la calpastatina y del CRH (cuya regulación también es muy importante en estrés) tienen elementos de respuesta a CREB (Cong y cols. 1998; Liu y cols., 2008; Arroba y cols., 2009). Las ratas estresadas prenatalmente presentaron un incremento en los

niveles de p-CREB en las tres áreas estudiadas. Este incremento en los niveles de p-CREB explicaría el incremento en los niveles de calpastatina, sugiriendo una ruta molecular directa que reduciría la proteólisis mediada por calpaína (Cong y cols. 1998; Arroba y cols., 2009). Por otro lado, la fosforilación de CREB regula la expresión de gran número de genes como son Bcl-2, Bax, p53 y calpastatina en distintos tipos celulares (Butt y cols., 1999; Zheng y Quirion, 2006; Arroba y cols., 2009). CREB se fosforila en respuesta a diferentes estímulos y esta fosforilación está implicada en la supervivencia celular mediada por IGF-I en diferentes tipos de neuronas (Kwon y cols., 2007; Arroba y cols., 2009), por tanto el IGF-I podría ser la señal que está induciendo los cambios a nivel celular en nuestro estudio. El IGF-I es un factor trófico que juega un importante papel en supervivencia y diferenciación de diferentes tipos celulares, así como en el mantenimiento de la homeostasis metabólica y el crecimiento durante el desarrollo (Zheng y Quirion, 2006; Chistyakova, 2008). Además, distintos artículos muestran que el IGF-I, sus receptores y sus proteínas de unión sufren una regulación positiva en situaciones de daño y neurodegenerativas (Connor y cols., 1997; Beilharz y cols. 1998) para inducir neuroprotección. Por otro lado, los glucocorticoides son los principales reguladores de la expresión de IGF-I en gran cantidad de órganos, incluyendo el cerebro (Adamo y cols., 1988). Se ha visto que el tratamiento con dexametasona reduce los niveles de ARNm de IGF-I tanto en neuronas como en astrocitos (Adamo y cols., 1988). En nuestro estudio el estrés por restricción de movimiento indujo un incremento de los niveles de ARNm de IGF-I en las ratas estresadas prenatalmente en las tres áreas y en el hipocampo de los machos E17 y una disminución de dichos niveles en el hipotálamo de los machos E17, sin cambios en las hembras en ninguna de las dos áreas en estudio. La diferente expresión de IGF-I y su receptor encontradas en el hipotálamo y el hipocampo de los embriones E17 puede ser el resultado del balance entre los niveles de glucocorticoides y la diferente distribución de sus receptores, estando los niveles de ARNm del receptor de glucocorticoides incrementados en el hipocampo de machos y hembras y no modificado en el hipotálamo. Además la privación de alimentos produce una disminución de los niveles de IGF-I y de su receptor en el hipotálamo, sin verse afectados en la hipófisis (Olchovsky y cols., 1993). Finalmente, hay datos corroborando que la expresión de IGF-I ocurre con un patrón espacial y temporal distinto, comenzando a partir del día embrionario 14 e

incrementando hasta llegar al pico máximo de expresión en la primera semana postnatal (Lai y cols., 2000). Por tanto, si a nivel basal tenemos distinta expresión de IGF-I en el hipocampo y el hipotálamo a lo largo del tiempo es posible que el estrés influya de manera distinta en cada una de las áreas. Finalmente, los datos obtenidos en este trabajo nos indicarían que el IGF-I está actuando de forma autocrina o paracrina. La acción del IGF-I regulando al sistema calpastatina-calpaínas vía CREB y en último término inhibiendo la muerte celular se ha descrito en otros modelos (Arroba y cols., 2009).

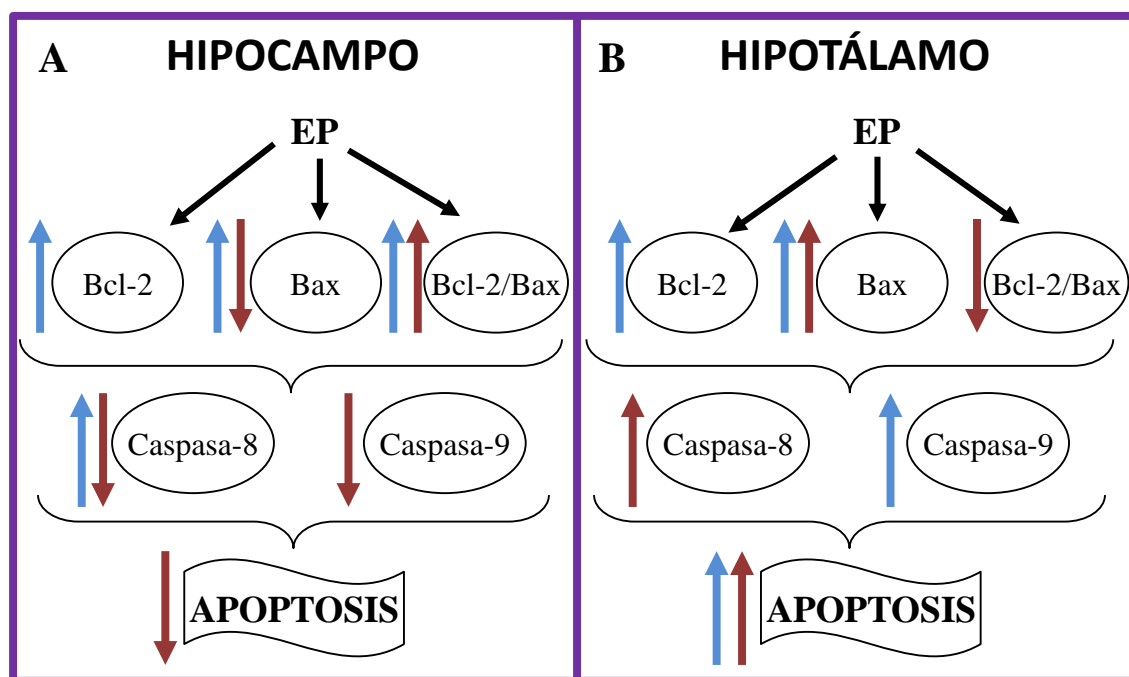
Como se desprende de estos resultados el estrés prenatal induce diferentes efectos dependiendo del área cerebral y de la edad de los animales en el momento del estudio. Dependiendo del tipo de receptores que se activen, el estrés prenatal tendrá unos efectos u otros. La activación del receptor de glucocorticoides induce apoptosis en las células granulares del hipocampo y sin embargo, la activación del receptor de mineralocorticoides induce el efecto opuesto (Almeida y cols., 2000). En nuestro estudio en embriones se observó un incremento de los niveles de ARNm del receptor de glucocorticoides en el hipocampo de machos y hembras, pero no en el hipotálamo. Otros factores importantes a tener en cuenta son el sexo de los animales y la edad de éstos en el momento del estudio. El estrés prenatal disminuye los niveles de proliferación y la neurogénesis hipocampal desde la adolescencia a la senescencia en los machos y sin embargo, en las hembras únicamente se ve este efecto en la senescencia (Koehl y cols., 2009).

En resumen, nuestros datos en ratas adultas sugieren que el estrés prenatal induce una ralentización o desaceleración a largo plazo en el ratio de muerte celular y proliferación en el eje hipocampo-hipotálamo-hipofisario de ratas macho adultas. El incremento en el IGF-I local podría estar involucrado en el incremento de los niveles de calpastatina vía CREB, dando lugar a la inhibición de calpaína-2 y posteriormente reduciendo la activación de la vía extrínseca de apoptosis (Figura 44).



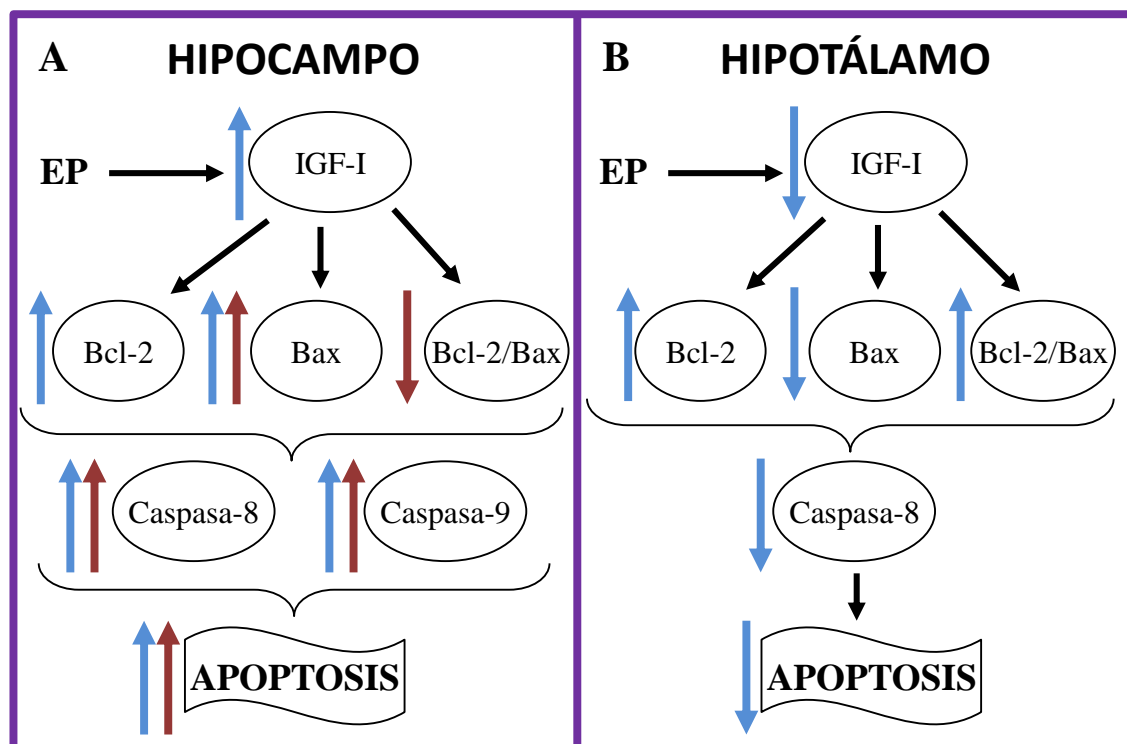
**Figura 44:** Diagrama que representa el mecanismo propuesto para la inhibición de la muerte celular inducido por el estrés prenatal en el hipocampo, el hipotálamo y la hipófisis en ratas macho adultas.

En el hipocampo de los ratones hembra adultos se observó una disminución de la muerte celular mediada por la inhibición de los niveles de caspasa-8, caspasa-9 y Bax y por el incremento del ratio Bcl-2/Bax (Figura 45A). En el hipotálamo tanto de machos como de hembras se observó un incremento de los niveles de muerte celular mediado en el caso de los machos por la activación de la caspasa-9 y en el caso de las hembras por la activación de la caspasa-8 (Figura 45B).



**Figura 45:** Diagrama que representa el mecanismo propuesto para la activación o inhibición de la muerte celular inducida por el estrés prenatal en el hipocampo (A) y en el hipotálamo (B) en ratones macho (flechas azules) y hembra (flechas rojas) adultos.

En el hipocampo de los machos y las hembras E17 se observó un incremento de los niveles de muerte celular mediada por la activación de la caspasa-8 y la caspasa-9. La diferencia entre ambos sexos es que en machos parece existir un mecanismo de protección, ya que, existe un incremento de la síntesis de IGF-I local y de los niveles de Bcl-2 (Figura 46A). En el hipotálamo de los machos E17 se observó una disminución de los niveles de muerte celular mediada por una disminución de la caspasa-8 y un incremento de los niveles de Bcl-2 y del ratio Bcl-2/Bax (Figura 46B).



**Figura 46:** Diagrama que representa el mecanismo propuesto para la activación o la inhibición de la muerte celular inducida por el estrés prenatal en el hipocampo (A) y en el hipotálamo (B) en ratones macho (flechas azules) y hembra (flechas rojas) E17.

Para estudiar si la expresión de las distintas hormonas secretadas por la adenohipófisis estaba siendo afectada por los cambios inducidos por el estrés prenatal se llevó a cabo un estudio de los niveles de ARNm de dichas hormonas mediante RT-PCR. El estrés prenatal incrementó los niveles de PRL, POMC, LH, FSH y TSH y no modificó los niveles de GH. La síntesis de GH y TSH disminuye con la edad en ratas control y la de POMC incrementa, pero no en ratas sometidas a restricción de comida. Así a los 6 meses de edad estas diferencias ya son observables en comparación con animales de tres meses (Han y cols., 2001), por tanto pudiera ser que en nuestro experimento el efecto que creemos que es del estrés prenatal, podría ser una disminución de los niveles de hormonas en las ratas control. Whirledge y Cidlowski observaron que los glucocorticoides inhibían la síntesis y secreción de LH y FSH (Whirledge y Cidlowski, 2010). Sin embargo, Lalau y cols., observaron un incremento de los niveles del contenido hipofisario de LH en fetos de 19 días de edad (Lalau y cols., 1990). Por tanto, el estrés prenatal estaría induciendo cambios en la composición final de la hipófisis, lo que podría dar lugar a cambios en la

secreción de dichas hormonas y como consecuencia modificar la respuesta metabólica, además de otras alteraciones.

Como resultado del estrés prenatal y de los cambios en muerte celular y proliferación se podrían producir modificaciones tanto en las neuronas como en los astrocitos, ya que, ambas poblaciones celulares tienen receptores de mineralocorticoides y glucocorticoides (Bohn y cols., 1991). Para estudiar si astrocitos y neuronas estaban afectados en el hipocampo y en el hipotálamo se analizaron los niveles de GFAP y Tuj-1, marcadores específicos de astrocitos y neuronas respectivamente, mediante “Western blotting”, no observándose diferencias significativas en ninguno de los grupos en estudio en las ratas. En los embriones se observó que el estrés prenatal incrementó los niveles de GFAP en el hipocampo y disminuyó los de Tuj-1 en el hipotálamo de los machos. En las hembras, el estrés prenatal disminuyó los niveles de GFAP y Tuj-1 tanto en el hipocampo como en el hipotálamo. Estos cambios en neuronas y astrocitos junto con las alteraciones en el recambio celular (muerte y proliferación) darán lugar a cambios en dichas poblaciones celulares también en el adulto. Al estudiar los ratones adultos observamos que el estrés prenatal incrementó los niveles de GFAP y Tuj-1 en el hipocampo y disminuyó los de GFAP en el hipotálamo de los machos. En las hembras, el estrés prenatal incrementó los niveles de GFAP en el hipocampo y disminuyó los de Tuj-1 en ambas áreas cerebrales. Estas modificaciones pueden ser debidas tanto al incremento como a la reducción del número de células o a cambios en su morfología. Muchos estudios han demostrado que el estrés prenatal induce un efecto negativo en el desarrollo y la supervivencia de las neuronas hipocampales, afectando al proceso de neurogénesis (Lemaire y cols., 2000; Coe y cols., 2003; Van den Hove y cols., 2006; Fujioka y cols., 2006; Lemaire y cols., 2006; Koehl y cols., 2009), así como modificaciones en las neuronas del núcleo paraventricular del hipotálamo en edad fetal (Fujioka y cols., 1999). El estrés crónico también induce degeneración y pérdida celular en el cerebro adulto (Magariños y McEwen, 1995). Además se ha visto, que el incremento en la cantidad de glucocorticoides producido por un estrés durante un largo periodo de tiempo por inmovilización induce pérdida neuronal y cambios morfológicos con pérdida, atrofia o remodelación de espinas dendríticas (Sapolsky, 1996; Radley y Morrison, 2005; Sugama y cols., 2007) y pérdida de sinapsis excitatorias en el hipocampo y la corteza prefrontal (Radley y Morrison, 2005). Diz-Chaves y cols.,

observaron que las neuronas hipocampales procedentes de animales estresados prenatalmente crecidas en cultivo desarrollaban antes que las neuronas procedentes de animales control, es decir, en el mismo momento las neuronas EP tenían mayor tamaño del soma neuronal y mayor número de neuritas primarias (Diz-Chaves y cols., 2013). Además, es conocido que los glucocorticoides regulan tanto la diferenciación como la maduración astrocítica (Bohn y cols., 1991), así como la producción de GFAP (O'Callaghan y cols., 1989). El estrés prenatal por restricción de movimiento durante la última semana de gestación incrementó los niveles de la proteína GFAP y S100B en animales adultos, observándose por tanto una acción astrogial en respuesta a estrés (Barros y cols., 2006). Además, se ha visto que la expresión de diversos factores de crecimiento implicados en la regulación del destino celular como el IGF-I pueden determinar el tamaño de la población neuronal o glial, tanto en cerebros en desarrollo como en el cerebro adulto (Kuhn y cols., 1997; Pencea y cols., 2001). La falta de efecto en estas poblaciones celulares en las ratas estresadas prenatalmente pudiera ser debida a una recuperación total del animal como demuestran los niveles normales de corticosterona (García-Cáceres y cols., 2010b).

Al comparar machos y hembras se observó que las hembras E17 control tenían mayores niveles de muerte celular y de PCNA que los machos en el hipocampo como ya observaron otros autores (Mandyam y cols., 2008) y menores niveles de muerte celular en el hipotálamo. Ahern y cols., demostraron que los niveles de muerte celular eran distintos en machos y hembras y además éstos niveles variaban con la edad en 16 regiones distintas del hipotálamo y del prosencéfalo ventral (Ahern y cols., 2013). Además, se observó que las hembras E17 control tenían mayores niveles de GFAP y Tuj-1 que los machos en el hipocampo. Esto podría ser debido a que tanto los astrocitos como las neuronas están claramente afectados por las hormonas gonadales, puesto que ambos tipos de células tienen receptores para estas hormonas (Jung-Testas y cols., 1991). Hay estudios que relacionan bajos niveles de testosterona con un incremento en la expresión de GFAP (Laping y cols., 1994). Por tanto, las diferencias que observamos entre machos y hembras en los niveles de GFAP podrían ser debidas al menos en parte, a la diferencia en los niveles de testosterona, ya que como se ha comentado anteriormente los machos en edad embrionaria tienen mayor cantidad de testosterona que las hembras (Turkelson y cols., 1977; Weisz y Ward, 1980).

Por tanto, el estrés prenatal induce cambios en el recambio celular a corto y largo plazo, siendo estos cambios diferentes en machos y hembras. Además, dicho efecto es



diferente en el hipocampo y el hipotálamo de ratones en edad embrionaria y ratones adultos probablemente debido a la distinta activación de los receptores de glucocorticoides, sin embargo, al analizar este efecto más a largo plazo se observó que todas las áreas cerebrales se veían afectadas por igual. Como consecuencia de estos cambios tanto neuronas como astrocitos presentaban alteraciones.

*Efecto de una dieta rica en sacarosa introducida en la etapa adulta sobre el recambio celular*

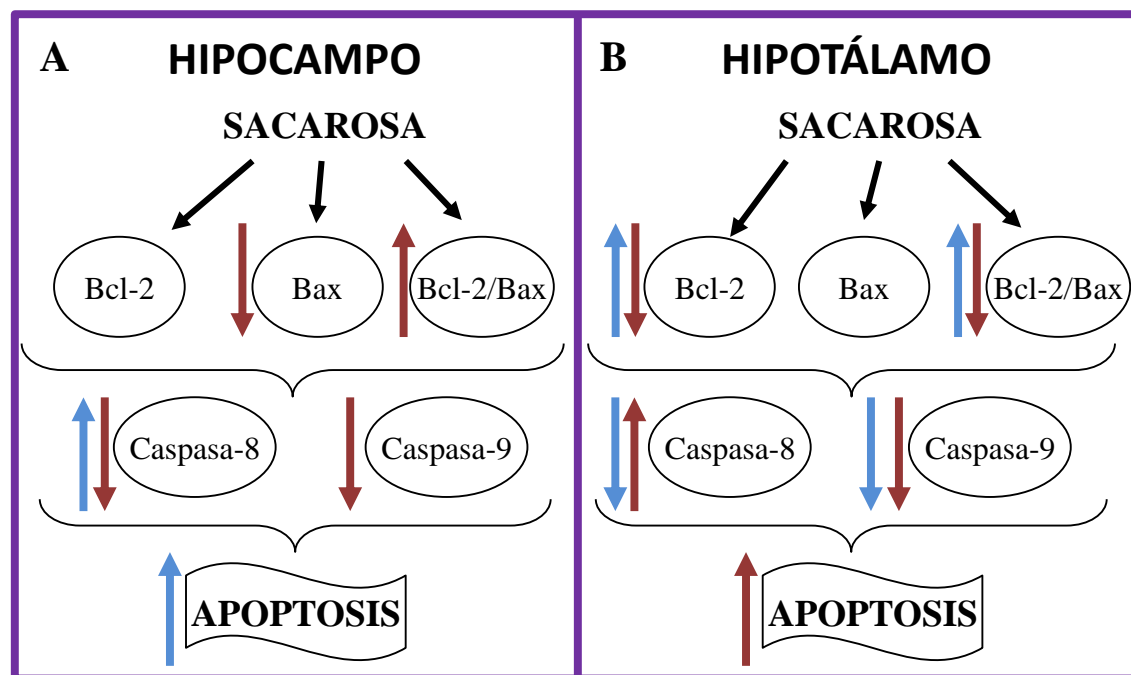
Van der Borgh y cols., demostraron que una dieta rica en sacarosa, glucosa o fructosa incrementaba el número de células que estaban proliferando y los niveles de muerte celular en el giro dentado del hipocampo (Van der Borgh y cols., 2011). Otros tipos de dieta como pueden ser una dieta rica en grasa (Olivo-Marston y cols., 2008; de Assis y cols., 2009) o un consumo de chocolate (Krolow y cols., 2010) inducen rotura del ADN celular en el hipocampo, al igual que una dieta rica en grasa está también asociada con la inducción de apoptosis en neuronas hipotalámicas (Moraes y cols., 2009; McNay y cols., 2012; Thaler y cols., 2012). Además, dichos efectos son también dependientes del área cerebral estudiada, así Krolow y cols., observaron que una dieta rica en chocolate inducía rotura de ADN en el hipocampo de hembras, pero no en el estriado (Krolow y cols., 2010). En nuestro estudio observamos como la ingesta de sacarosa incrementó los niveles de muerte celular en el hipocampo de machos y en el hipotálamo de hembras, sin modificarlos en el hipocampo de hembras y el hipotálamo de machos. Sin embargo, aumenta la proliferación solo en el hipocampo tanto de machos como de hembras. El incremento de los niveles de apoptosis observados se corresponde con un incremento de los niveles de caspasa-8.

La ingesta de sacarosa induce un efecto diferencial sobre los niveles de muerte celular, proliferación y su regulación en los animales control y en los animales estresados, aunque nuevamente este efecto depende del área cerebral a estudiar y del sexo de los animales. El consumo de una dieta rica en sacarosa previene alguno de los efectos inducidos por estrés en el hipocampo de ratas juveniles como es la alteración del número de células vivas y de células apoptóticas (Krolow y cols., 2013). El estrés prenatal evitó el incremento de muerte que conlleva la ingesta de sacarosa en el hipocampo de los machos. La ingesta de sacarosa revierte la disminución de los niveles de muerte celular y de

caspara-8 inducida por el estrés prenatal en el hipocampo de hembras. Los niveles de proliferación en el hipocampo de los animales EPS estaban afectados de igual manera que los animales CTS, por lo tanto, el estrés prenatal no inducía ningún efecto. Sin embargo, en el hipotálamo se observó que la ingesta de sacarosa revertía el aumento de muerte celular, de proliferación y de los niveles de caspara-9 inducidos por el estrés prenatal en los machos, mientras que en las hembras existía un efecto aditivo sobre los niveles de muerte celular. Los niveles de proliferación en el hipotálamo de hembras se encontraban incrementados en el grupo sometido a ambos estímulos, mientras que no se modificaban en los animales sometidos a un único estímulo.

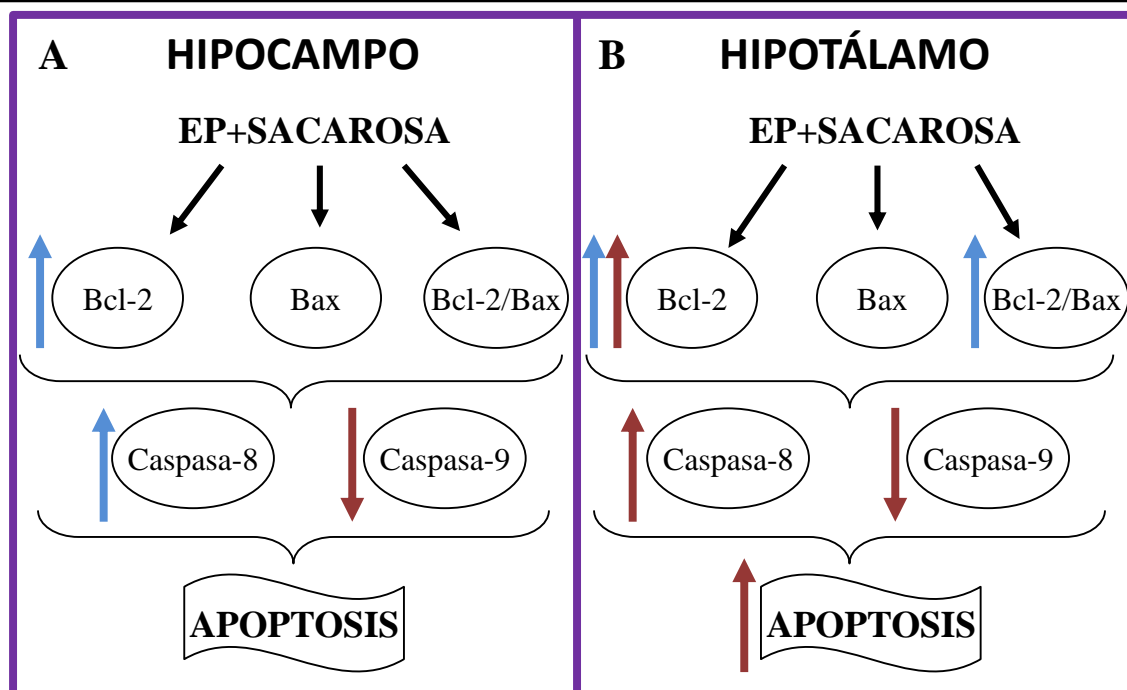
La regulación del proceso de muerte celular parece ser distinta en el hipocampo y el hipotálamo, ya que, en el hipocampo de machos no se modificaron ni los niveles de Bcl-2, ni los de Bax y por tanto, tampoco el ratio Bcl-2/Bax, y sin embargo, en el hipotálamo de las hembras se observó una disminución de Bcl-2 y del ratio Bcl-2/Bax. Una disminución del ratio Bcl-2/Bax y el incremento en la proteína pro-apoptótica Bax, está relacionado con la activación de las caspasas (Cheng y cols., 2008) y, por tanto, con el incremento de apoptosis. La ingesta de sacarosa en el grupo EPS evita el incremento en los niveles de Bcl-2 y de Bax inducidos por el estrés prenatal en el hipocampo y el hipotálamo de los machos. En el hipocampo y en el hipotálamo de las hembras la combinación de ambos estímulos induce un efecto opuesto al inducido por cada uno de los estímulos sobre los niveles de Bax y sobre el ratio Bcl-2/Bax.

En resumen, puede afirmarse que la ingesta de sacarosa induce un incremento en los niveles de muerte celular en el hipocampo de los machos y en el hipotálamo de las hembras. Este incremento es mediado por la activación de la caspara-8 en ambos sexos y por la disminución de los niveles de Bcl-2 y del ratio Bcl-2/Bax en el hipotálamo de las hembras, sin cambios en estas proteínas en el hipocampo de los machos (Figura 47A y 47B, respectivamente).



**Figura 47:** Diagrama que representa el mecanismo propuesto para la activación de la muerte celular inducida por la ingesta de sacarosa en el hipocampo (A) y en el hipotálamo (B) en ratones macho (flechas azules) y hembra (flechas rojas) adultos.

En los animales sometidos a estrés prenatal y que bebieron sacarosa en la vida adulta no se observaron diferencias en los niveles de muerte celular respecto a los animales control ni en machos, ni en hembras. Aunque existía un incremento de los niveles de caspasa-8 y de Bcl-2 en los machos y una disminución de caspasa-9 en las hembras (Figura 48A). En el hipotálamo se observó un incremento de los niveles de muerte celular en las hembras que iba acompañado de un incremento en los niveles de caspasa-8 y Bcl-2 y una disminución de los niveles de caspasa-9. En el hipotálamo de los machos únicamente se observó un incremento de Bcl-2 y del ratio Bcl-2/Bax, sin cambios en los niveles de muerte celular (Figura 48B).



**Figura 48:** Diagrama que representa el mecanismo propuesto para la activación de la muerte celular inducida por la combinación del estrés prenatal y de la ingesta de sacarosa en el hipocampo (A) y en el hipotálamo (B) en ratones macho (flechas azules) y hembra (flechas rojas) adultos. El efecto es comparado con respecto a los animales control.

Las células gliales se activan en respuesta a una dieta rica en grasa (Horvath y cols., 2010; Thaler y cols., 2012) o una dieta rica en colesterol (Crisby y cols., 2004). La ingesta de una dieta rica en grasa o en azúcares (glucosa o sacarosa) también es capaz de activar a las neuronas POMC en el núcleo arcuato del hipotálamo (Matsumura y cols., 2012). Así, se observó que la ingesta de sacarosa incrementó los niveles de GFAP y Tuj-1 en el hipocampo de los machos y los disminuyó en el hipotálamo. En las hembras, la ingesta de sacarosa disminuyó los niveles de Tuj-1 en ambas áreas cerebrales e incrementó los niveles de GFAP en el hipotálamo, sin modificarlos en el hipocampo. Distintos tipos de dietas, como pueden ser dietas ricas en fructosa o en sacarosa (Van der Borgh y cols., 2011) o una dieta rica en grasa (Lindqvist y cols., 2006) reducen la neurogénesis en el hipocampo y en el hipotálamo (McNay y cols., 2012), siendo estos efectos distintos en machos y hembras (Lindqvist y cols., 2006). Además, se ha observado que la ingesta de sacarosa durante 2 meses disminuye los niveles de GFAP en el hipotálamo de ratas macho, así como el número de astrocitos y el número de proyecciones (Fuente-Martín, 2011; Fuente-Martín y cols., 2013). También disminuyen los niveles de GFAP en machos con una dieta rica en

grasa (Mela y cols., 2012). En nuestro estudio, estas modificaciones de GFAP y Tuj-1 no parecen deberse únicamente al número de células, ya que, en algunos casos no van acompañados de cambios en los niveles de proliferación. Por tanto, parece que la dieta rica en sacarosa induce cambios morfológicos tanto en astrocitos como en neuronas. Sin embargo, la ingesta de sacarosa produce una disminución de los niveles de GFAP y Tuj-1 en los hipocampos de los machos estresados. El estrés prenatal en los animales EPS evita el efecto inducido por la sacarosa, tanto en los niveles de Tuj-1 en el hipotálamo de machos, como en los niveles de GFAP en el hipotálamo de hembras, probablemente debido a los cambios existentes en la muerte celular y la proliferación.

Por tanto, los efectos de la ingesta de sacarosa sobre la muerte celular y la proliferación son diferentes en el hipocampo y el hipotálamo. Estos cambios darán como resultado modificaciones tanto en astrocitos como en neuronas, viéndose afectado no solamente el número de células existentes, sino probablemente también su estructura. Cuando combinamos el estrés prenatal con una dieta rica en sacarosa en la vida adulta se puede observar como ambos factores interactúan entre ellos como ocurre en el hipocampo de los machos, donde el estrés prenatal evita el incremento de muerte celular producido por la ingesta de sacarosa o bien, para inducir efectos sinérgicos como ocurre al estudiar la muerte celular y la proliferación en el hipotálamo de las hembras EPS.



## **CONCLUSIONES**





## **CONCLUSIONES**

1. En el modelo de estrés prenatal empleado no se evidencian cambios en el peso corporal a largo plazo.
2. El incremento de grasa que se produce en machos y hembras alimentados con sacarosa sólo se traduce en ganancia de peso en hembras y no en machos, a pesar de que ambos sexos aumentan la ingesta, probablemente debido al mayor gasto energético que tiene lugar en los machos.
3. El estrés prenatal condiciona los cambios metabólicos inducidos por una dieta rica en sacarosa y, además, este efecto se produce de manera distinta en machos y hembras.
4. El estrés prenatal y la ingesta de sacarosa modifican el recambio celular del eje hipocampo-hipotálamo-hipofisario induciendo cambios en la muerte celular y en la proliferación.
5. Los cambios en el recambio celular, así como en los marcadores de astrocitos y neuronas, GFAP y Tuj-1, producidos por una dieta rica en sacarosa están influidos por el estrés prenatal y éstos son diferentes en machos y hembras.



## **BIBLIOGRAFÍA**



**BIBLIOGRAFÍA**

- Adam TC, Epel ES (2007).** Stress, eating and the reward system. *Physiology & Behavior* 91(4):449-458
- Adamo M, Werner H, Farnsworth W, Roberts CT Jr, Raizada M, LeRoith D (1988).** Dexamethasone reduces steady state insulin-like growth factor 1 messenger ribonucleic acid levels in rat neuronal and glial cells in primary culture. *Endocrinology* 123(5):2565-2570
- Ahern TH, Krug S, Carr AV, Murray eK, Fitzpatrick E, Bengston L, McCutcheon J, De Vries GJ, Forger NG (2013).** Cell death atlas of the postnatal mouse ventral forebrain and hypothalamus: effects of age and sex. *The Journal of Comparative Neurology* 521(11):2551-2569
- Almeida OF, Condé GL, Crochemore C, Demeneix BA, Fischer D, Hassan AH, Meyer M, Holsboer F, Michaelidis TM (2000).** Subtle shifts in the ratio between pro- and antiapoptotic molecules after activation of corticosteroid receptors decide neuronal fate. *FASEB Journal* 14(5):779-790
- Alzamendi A, Castrogiovanni D, Ortega HH, Gaillard RC, Giovambattista A, Spinedi E (2010).** Parametrial adipose tissue and metabolic dysfunctions induced by fructose-rich diet in normal and neonatal-androgenized adult female rats. *Obesity (Silver Spring)* 18(3):441-448
- Amaral JD, Xavier JM, Steer CJ, Rodrigues CM (2010).** The role of p53 in apoptosis. *Discovery Medicine* 9(45):145-152
- Amsterdam A, Tajima K, Sasson R (2002).** Cell-specific regulation of apoptosis by glucocorticoids: implication to their anti-inflammatory action. *Biochemical Pharmacology* 64(5-6):843-850
- Anaya-Velázquez F, Padilla-Vaca F (2010).** Conceptos y definiciones de la vida y la muerte. *Acta Universitaria* 20(3):9-15
- Angelogianni P, Li HL, Gianoulakis C (2000).** Ontogenesis of proopiomelanocortin and its processing to beta-endorphin by the fetal and neonatal rat brain. *Neuroendocrinology* 72(4):231-241
- Archer ZA, Mercer JG (2007).** Brain responses to obesogenic diets and diet-induced obesity. *The Proceedings of the Nutrition Society* 66(1):124-130
- Arroba AI, Wallace D, Mackey A, de la Rosa EJ, Cotter TG (2009).** IGF-I maintains calpastatin expression and attenuates apoptosis in several models of photoreceptor cell death. *The European Journal of Neuroscience* 30(6):975-986
- Arturi F, Succurro E, Procopio C, Pedace E, Mannino GC, Lugarà M, Procopio T, Andreozzi F, Sciacqua A, Hribal ML, Peticone F, Sesti G (2011).** Nonalcoholic fatty liver disease is

- associated with low circulating levels of insulin-like growth factor-I. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 96(10):E1640-E1644
- Ayroldi E, Cannarile L, Migliorati G, Nocentini G, Delfino DV, Riccardi C (2012).** Mechanisms of the anti-inflammatory effects of glucocorticoids: genomic and nongenomic interference with MAPK signaling pathways. *FASEB Journal* 26(12):4805-4820
- Baker S, Chebli M, Rees S, Lemarec N, Godbout R, Bielajew C (2008).** Effects of gestational stress: 1. Evaluation of maternal and juvenile offspring behavior. *Brain Research* 1213:98-110
- Bale TL, Anderson KR, Roberts AJ, Lee KF, Nagy TR, Vale WW (2003).** Corticotropin releasing factor receptor-2-deficient mice display abnormal homeostatic responses to challenges of increased dietary fat and cold. *Endocrinology* 144(6):2580-2587
- Barbazanges A, Piazza PV, Le Moal M, Maccari S (1996).** Maternal glucocorticoid secretion mediates long-term of prenatal stress. *The Journal of Neuroscience* 16(12):3943-3949
- Barker DJ (2001).** The malnourished baby and infant. *British Medical Bulletin* 60:69-88
- Barros VG, Duhalde-Vega M, Caltana L, Brusco A, Antonelli MC (2006).** Astrocyte-neuron vulnerability to prenatal stress in the adult rat brain. *Journal of Neuroscience Research* 83(5):787-800
- Beilharz EJ, Russo VC, Butler G, Baker NL, Connor B, Sirimanne ES, Dragunow M, Werther GA, Gluckman PD, Williams CE, Scheepens A (1998).** Co-ordinated and cellular specific induction of the components of the IGF/IGFBP axis in the rat brain following hypoxic-ischemic injury. *Brain Research. Molecular Brain Research* 59(2):119-134
- Berardelli R, Karamouzis I, D'Angelo V, Zichi C, Fussotto B, Giordano R, Ghigo E, Arvat E (2013).** Role of mineralocorticoid receptors on the hypothalamus-pituitary-adrenal axis in humans. *Endocrine* 43(1):51-58
- Bergman RN, Kim SP, Hsu IR, Catalano KJ, Chiu JD, Kabir M, Richey JM, Ader M (2007).** Abdominal obesity: role in the pathophysiology of metabolic disease and cardiovascular risk. *The American Journal of Medicine* 120(2 Suppl 1):S3-S8
- Bertram CE, Hanson MA (2002).** Prenatal programming of postnatal endocrine responses by glucocorticoids. *Reproduction* 124(4):459-467
- Bittar EE, Bittar N (1997).** Principles of medical biology. *Molecular and cellular endocrinology*.
- Blanchard RJ, McKittrick CR, Blanchard DC (2001).** Animal models of social stress: effects on behavior and brain neurochemical systems. *Physiology and Behavior* 73(3):261-271
- Blondeau B, Lesage J, Czernichow P, Dupouy JP, Bréant B (2001).** Glucocorticoids impair fetal beta-cell development in rats. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 281(3):E592-E599

- Bohn MC, Howard E, Vielkind U, Krozowski Z (1991).** Glial cells express both mineralocorticoid and glucocorticoid receptors. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 40(1-3):105-111
- Bose M, Oliván B, Laferrère B (2009).** Stress and obesity: the role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in metabolic disease. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity* 16(5):340-346
- Bowman RE, MacLusky NJ, Sarmiento Y, Frankfurt M, Gordon M, Luine VN (2004).** Sexually dimorphic effects of prenatal stress on cognition, hormonal responses, and central neurotransmitters. *Endocrinology* 145(8):3778-3787
- Breton C (2013).** The hypothalamus-adipose axis is a key target of developmental programming by maternal nutritional manipulation. *The Journal of Endocrinology* 216(2):R19-R31
- Brunson KL, Eghbal-Ahmadi M, Bender R, Chen Y, Baram TZ (2001).** Long-term, progressive hippocampal cell loss and dysfunction induced by early-life administration of corticotropin-releasing hormone reproduce the effects of early-life stress. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 98(15):8856-8861
- Buchwald U, Teupser D, Kuehnel F, Grohmann J, Schmieder N, Beindorff N, Schlumbohm C, Fuhrmann H, Einspainer A (2012).** Prenatal stress programs lipid metabolism enhancing cardiovascular risk in the female F1, F2, and F3 generation in the primate model common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Journal of Medical Primatology* 41(4):231-240
- Butt AJ, Firth SM, Baxter RC (1999).** The IGF-I axis and programmed cell death. *Immunology and Cell Biology* 77(3):256-262
- Cambri LT, Ghezzi AC, Ribeiro C, Dalia RA, de Mello MA (2010).** Recovery of rat growth and lipid profiles in adult rats subjected to fetal protein malnutrition with a fructose-rich diet. *Nutrition Research* 30(2):156-162
- Carbajo-Pérez E, Watanabe YG (1990).** Cellular proliferation in the anterior pituitary of the rat during the postnatal period. *Cell and Tissue Research* 261(2):333-338
- Castelli WP (1988).** Cholesterol and lipids in the risk of coronary artery disease – the Framingham Heart Study. *The Canadian Journal of Cardiology* 4(Suppl A):5A-10A
- Cheng WC, Leach KM, Hardwick JM (2008).** Mitochondrial death pathways in yeast and mammalian cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1783(7):1272-1279
- Chepulis L, Starkey N (2008).** The long-term effects of feeding honey compared with sucrose and a sugar-free diet on weight gain, lipid profiles, and DEXA measurements in rats. *Journal of food science* 73(1):H1-H7

- Chistyakova OV (2008).** Signaling pathway of Insulin and Insulin Like Growth Factor 1 (IGF-1) as a potential regulator of lifespan. *Journal of Evolutionary. Biochemistry and Physiology* 44(1):3-11
- Chong MF, Fielding BA, Frayn KN (2007).** Mechanisms for the acute effect of fructose on postprandial lipemia. *The American Journal of Clinical Nutrition* 85(6):1511-1520
- Coe CL, Kramer M, Czéh B, Gould E, Reeves AJ, Kirschbaum C, Fuchs E (2003).** Prenatal stress diminishes neurogenesis in the dentate gyrus of juvenile Rhesus monkeys. *Biological Psychiatry* 54(10):1025-1034
- Cong M, Goll DE, Antin PB (1998).** cAMP responsiveness of the bovine calpastatin gene promoter. *Biochimica et Biophysica Acta* 1443(1-2):186–192
- Connor B, Beilharz EJ, Williams C, Synek B, Gluckman PD, Faull RL, Dragunow M (1997).** Insulin like growth factor-1 (IGF-1) immunoreactivity in the Alzheimer's disease temporal cortex and hippocampus. *Brain Research. Molecular Brain Research* 49(1-2):283-290
- Couvreux O, Ferezou J, Gripois D, Serougne C, Crépin D, Aubourg A, Gertler A, Vacher CM, Taouis M (2011).** Unexpected long-term protection of adult offspring born to high-fat fed dams against obesity induced by a sucrose-rich diet. *PLoS One* 6(3):e18043
- Crisby M, Rahman SM, Sylvén C, Winblad B, Schultzber M (2004).** Effects of high cholesterol diet on gliosis in apolipoprotein E knockout mice. Implications for Alzheimer's disease and stroke. *Neuroscience letters* 369(2):87-92
- D'mello AP, Liu Y (2006).** Effects of maternal immobilization stress on birth weight and glucose homeostasis in the offspring. *Psychoneuroendocrinology* 31(3):395-406
- Dallman MF, Akana SF, Strack AM, Hanson ES, Sebastian RJ (1995).** The neural network that regulates energy balance is responsive to glucocorticoids and insulin and also regulates HPA axis responsivity at a site proximal to CRF neurons. *Annals of the New York Academy of Sciences* 771:730-742
- Daniel PM (1976).** Anatomy of the hypothalamus and pituitary gland. *Journal of Clinical Pathology. Supplement* 7:1-7
- Darnaudéry M, Maccari S (2008).** Epigenetic programming of the stress response in male and female rats by prenatal restraint stress. *Brain Research Reviews* 57(2):571-585
- Das A, Guyton MK, Matzelle DD, Ray SK, Banik NL (2008).** Time-dependent increases in protease activities for neuronal apoptosis in spinal cords of Lewis rats during development of acute experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Neuroscience Research* 86(13):2992-3001
- De Assis AM, Rieger DK, Longoni A, Battu C, Raymundi S, da Rocha RF, Andreazza AC, Farina M, Rotta LN, Gottfried C, Gonçalves CA, Moreira JC, Perry ML (2009).** High fat



- and highly thermolyzed fat diets promote insulin resistance and increases DNA damage in rats. *Experimental Biology and Medicine* 234(11):1296-1304
- De Kloet ER, Reul JM (1987).** Feedback action and tonic influence of corticosteroids on brain function: a concept arising from the heterogeneity of brain receptor systems. *Psychoneuroendocrinology* 12(2):83-105
- De Queiroz KB, Rodovalho GV, Guimarães JB, de Lima DC, Coimbra CC, Evangelista EA, Guerra-Sá R (2012).** Endurance training blocks uncoupling protein 1 up-regulation in brown adipose tissue while increasing uncoupling protein 3 in the muscle tissue of rats fed with a high-sugar diet. *Nutrition Research* 32(9):709-717
- De Souza CT, Araujo EP, Bordin S, Ashimine R, Zollner RL, Boschero AC, Saad MJ, Velloso LA (2005).** Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology* 146(10):4192-4199
- Deaciuc IV, Song Z, Peng X, Barve SS, Song M, He Q, Knudsen TB, Singh AV, McClain CJ (2008).** Genome-wide transcriptome expression in the liver of a mouse model of high carbohydrate diet-induced liver steatosis and its significance for the disease. *Hepatology International* 2(1):39-49
- Debassio WA, Kemper TL, Galler JR, Tonkiss J (1994).** Prenatal malnutrition effect on pyramidal and granule cell generation in the hippocampal formation. *Brain Research Bulletin* 35(1):57-61
- deGroot J, Chusid, J (1989).** *Neuroanatomía correlativa*. 8ª edición. Mexicocity: El Manual Moderno, S.A.
- Delahaye F, Breton C, Risold PY, Enache M, Dutriez-Casteloot I, Laborie C, Lesage J, Vieau D (2008).** Maternal perinatal undernutrition drastically reduces postnatal leptin surge and affects the development of arcuate nucleus proopiomelanocortin neurons in neonatal male rat pups. *Endocrinology* 149(2):470-475
- Desai M, Gayle D, Babu J, Ross MG (2007).** The timing of nutrient restriction during rat pregnancy/lactation alters metabolic syndrome phenotype. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 196(6):555.e1-e7
- Diéguez C, Aguilar E (1997).** Integración neuroendocrina y regulación de la secreción hormonal adenohipofisaria. Capítulo 2; libro tratado de endocrinología pediátrica; autor Argemí J
- Diz-Chaves Y, Baquedano E, Frago LM, Chowen JA, García-Segura LM, Arévalo MA (2013).** Maternal stress alters the developmental program of embryonic hippocampal neurons growing in vitro. *Psychoneuroendocrinology* 38(3):455-459

- Dziedzic B, Szemraj J, Bartkowiak J, Walczewska A (2007).** Various dietary fats differentially change the gene expression of neuropeptides involved in body weight regulation in rats. *Journal of Neuroendocrinology* 19(5):364-373
- Elliott SS, Keim NL, Stern JS, Teff K, Havel PJ (2002).** Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome. *The American Journal of Clinical Nutrition* 76(5):911-922
- Ellwood KC, Michaelis OE (1980).** Effect of dietary carbohydrates on blood lipid and glucose levels of lean Zucker rats. *Nutrition Reports International* 21:113-122
- Erhuma A, Bellinger L, Langley-Evans SC, Bennett AJ (2007).** Prenatal exposure to undernutrition and programming of responses to high-fat feeding in the rat. *The British Journal of Nutrition* 98(3):517-524
- Fan TJ, Han LH, Cong RS, Liang J (2005).** Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 37(11):719-727
- Fath T, Ke YD, Gunning P, Götz J, Ittner LM (2009).** Primary support cultures of hippocampal and substantia nigra neurons. *Nature Protocols* 4(1):78-85
- Feldmann HM, Golozubova V, Cannon B, Nedergaard J (2009).** UCP1 ablation induces obesity and abolishes diet-induced thermogenesis in mice exempt from thermal stress by living at thermoneutrality. *Cell Metabolism* 9(2):203-209
- Fernández G, Mena MP, Arnau A, Sánchez O, Soley M, Ramírez I (2000).** Immobilization stress induces c-Fos accumulation in liver. *Cell Stress & Chaperones* 5(4):306-312
- Forbes K, Westwood M (2008).** The IGF axis and placental function. A mini review. *Hormone Research* 69(3):129-137
- Fossati P, Romon-Rousseaux M (1987).** Insulin and HDL-cholesterol metabolism. *Diabète & Métabolisme* 13(3 Pt 2):390-394
- Fowden AL (2003).** The insulin-like growth factors and feto-placental growth. *Placenta* 24(8-9):803-812
- Fowden AL, Sibley C, Reik W, Constancia M (2006).** Imprinted genes, placental development and fetal growth. *Hormone Research* 65(Suppl 3):50-58
- Frago LM, Pañeda C, Argente J, Chowen JA (2005).** Growth hormone-releasing peptide-6 increases insulin-like growth factor-I mRNA levels and activates Akt in RCA-6 cells as a model of neuropeptide Y neurones. *Journal of Neuroendocrinology* 17(11):701-710
- Frago LM, Pañeda C, Dickson SL, Hewson AK, Argente J, Chowen JA (2002).** Growth hormone (GH) and GH-releasing peptide-6 increase brain insulin-like growth factor-I expression and activate intracellular signalling pathways involved in neuroprotection. *Endocrinology* 143(10):4113-4122

- Franco SJ, Huttenlocher A (2005).** Regulating cell migration: calpains make the cut. *Journal of Cell Science* 118(Pt 17):3829-3838
- Fride E, Dan Y, Feldon J, Halevy G, Weinstock M (1986).** Effects of prenatal stress on vulnerability to stress in prepubertal and adult rats. *Physiology & Behavior* 37(5):681-687
- Fridman JS, Lowe SW (2003).** Control of apoptosis by p53. *Oncogene* 22(56):9030-9040
- Fu YF, Fan TJ (2002).** Bcl-2 family proteins and apoptosis. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 34(4):389-394
- Fuente-Martín E (2011).** Implicaciones de los astrocitos hipotalámicos en las alteraciones metabólicas y en los cambios de composición corporal inducidos por malnutrición en los periodos neonatal y adulto: nuevas acciones de la leptina y la ghrelina. Tesis Doctoral
- Fuente-Martín E, García-Cáceres C, Díaz F, Argente-Arizón P, Granado M, Barrios V, Argente J, Chowen JA (2013).** Hypothalamic inflammation without astrogliosis in response to high sucrose intake is modulated by neonatal nutrition in male rats. *Endocrinology* 154(7):2318-2330
- Fuente-Martín E, García-Cáceres C, Granado M, Sánchez-Gallido MA, Tena-Sempere M, Frago LM, Argente J, Chowen JA (2012a).** Early postnatal overnutrition increases adipose tissue accrual in response to a sucrose-enriched diet. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 302(12):E1586-E1598
- Fuente-Martín E, Granado G, García-Cáceres C, Sánchez-Garrido MA, Frago LM, Tena-Sempere M, Argente J, Chowen JA (2012b).** Early nutritional changes induce sexually dimorphic long-term effects on body weight gain and the response to sucrose intake in adult rats. *Metabolism* 61(6):812-822
- Fujioka A, Fujioka T, Ishida Y, Maekawa T, Nakamura S (2006).** Differential effects of prenatal stress on the morphological maturation of hippocampal neurons. *Neuroscience* 141(2):907-915
- Fujioka T, Sakata Y, Yamaguchi K, Shibasaki T, Kato H, Nakamura S (1999).** The effects of prenatal stress on the development of hypothalamic paraventricular neurons in fetal rats. *Neuroscience* 92(3):1079-1088
- Gaillard RC, Al-Damluji S (1987).** Stress and the pituitary-adrenal axis. *Baillière's clinical endocrinology and metabolism* 1(2):319-354
- Galluzzi L, Maiuri MC, Vitale I, Zischka H, Castedo M, Zitvogel L, Kroemer G (2007).** Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death and differentiation* 14(7):1237-1243

- Gao P, Ishige A, Murakami Y, Nakata H, Oka J, Munakata K, Yamamoto M, Nishimura K, Watanabe K (2011).** Maternal stress affects postnatal growth and the pituitary expression of prolactin in mouse offspring. *Journal of Neuroscience Research* 89(3):329-340
- García-Cáceres C, Diz-Chaves Y, Lagunas N, Calmarza-Font I, Azcoitia I, García-Segura LM, Frago LM, Argente J, Chowen JA (2010a).** The weight gain response to stress during adulthood is conditioned by both sex and prenatal stress exposure. *Psychoneuroendocrinology* 35(3):403-413
- García-Cáceres C, Lagunas N, Calmarza-Fon I, Azcoitia I, Diz-Chaves Y, García-Segura LM, Baquedano E, Frago LM, Argente J, Chowen JA (2010b).** Gender differences in the long-term effects of chronic prenatal stress on the HPA axis and hypothalamic structure in rats. *Psychoneuroendocrinology* 35(10):1525-1535
- Ghavami S, Hashemi M, Ande SR, Yeganeh B, Xiao W, Eshraghi M, Bus CJ, Kadkhoda K, Wiechec E, Halayko AJ, Los M (2009).** Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes. *Journal of Medical Genetics* 46(8):497-510
- Gibson SA (1996).** Are high-fat, high-sugar foods and diets conducive to obesity? *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 47(5):405-415
- Glowinski J e Iversen LL (1966).** Regional studies of catecholamines in the rat brain. I. The disposition of [<sup>3</sup>H]norepinephrine, [<sup>3</sup>H]dopamine and [<sup>3</sup>H]DOPA in various regions of the brain. *Journal of Neurochemistry* 13(8): 655-669
- Godfrey KM, Inskip HM, Hanson MA (2011).** The long-term effects of prenatal development on growth and metabolism. *Seminars in Reproductive Medicine* 29(3):257-265
- Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J (2003).** The calpain system. *Physiological Reviews* 83(3):731-801
- González-Jiménez E, Schmidt Río-Valle J (2012).** Regulación de la ingesta alimentaria y del balance energético; factores y mecanismos implicados. *Nutrición Hospitalaria* 27(6):1850-1859
- González-Parra S, Argente J, García-Segura LM, Chowen JA (2000).** Effect of neonatal and adult testosterone treatment on the cellular composition of the adult female rat anterior pituitary. *The Journal of Endocrinology* 164(3):265-276.
- Gould E, Beylin A, Tanapat P, Reeves A, Shors TJ (1999).** Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nature Neuroscience* 2(3):260-265
- Grasa MM (2004).** Glucocorticoides y obesidad. *Revista española de obesidad* 2(1):13-30
- Gressens P, Muaku SM, Besse L, Nsegbe E, Gallego J, Delpech B, Gaultier C, Evrard P, Ketelslegers JM, Maiter D (1997).** Maternal protein restriction early in rat pregnancy alters brain development in the progeny. *Brain Research. Developmental Brain Research* 103(1):21-35

- Gropp E, Shanabrough M, Borok E, Xu AW, Janoschek R, Buch T, Plum L, Balthasar N, Hampel B, Waisman A, Barsh GS, Horvath TL, Brüning JC (2005).** Agouti-related peptide-expressing neurons are mandatory for feeding. *Nature Neuroscience* 8(10):1289-1291
- Grove KL, Fried SK, Greenberg AS, Xiao XQ, Cleqq DJ (2010).** A microarray analysis of sexual dimorphism of adipose tissues in high-fat-diet-induced obese mice. *International Journal of Obesity* 34(6):989-1000
- Grupo de trabajo de la Guía de Práctica Clínica sobre la Prevención y el Tratamiento de la Obesidad Infantojuvenil.** Centro Cochrane Iberoamericano, coordinador. Guía de Práctica Clínica sobre la Prevención y el Tratamiento de la Obesidad Infantojuvenil. Plan de Calidad para el Sistema Nacional de Salud del Ministerio de Sanidad y Política Social. Agència d'Avaluació de Tecnologia i Recerca Mèdiques; 2009. Guías de Práctica Clínica en el SNS: AATRM N° 2007/25.
- Gutin B, Johnson MH, Humphries MC, Hatfield-Laube JL, Kapuku GK, Allison JD, Gower BA, Daniels SR, Barbeau P (2007).** Relationship of visceral adiposity to cardiovascular disease risk factors in black and white teens. *Obesity* 15(4):1029-1035
- Haines DE (2003).** Principios de Neurociencia. 2ª Edición. Elsevier España SA.
- Haines DE (2010).** Lippincott's Illustrated Q&A Review of Neuroscience.
- Hajnoczky G, Davies E, Madesh M (2003).** Calcium signaling and apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 304(3):445-454
- Hamada H, Tashima Y, Kisaka Y, Iwamoto K, Hanai T, Eguchi Y, Okamoto M (2009).** Sophisticated framework between cell cycle arrest and apoptosis induction based on p53 dynamics. *PLoS One* 4(3):e4795
- Han ES, Evans TR, Lee S, Nelson JF (2001).** Food restriction differentially affects pituitary hormone mRNAs throughout the adult life span of male F344 rats. *The Journal of Nutrition* 131(6):1687-1693
- Hansen MJ, Ball MJ, Morris MJ (2001).** Enhanced inhibitory feeding response to alpha-melanocyte stimulating hormone in the diet-induced obese rat. *Brain Research* 892(1):130-137
- Harris RB, Apolzan JW (2012).** Changes in glucose tolerance and leptin responsiveness of rats offered a choice of lard, sucrose, and chow. *American Journal of Physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 302(11):R1327-1339
- Haupt S, Berger M, Goldberg Z, Haupt Y (2003).** Apoptosis – the p53 network. *Journal of Cell Science* 116(Pt 20):4077-4085
- Havel PJ (2005).** Dietary fructose: implications for dysregulation of energy homeostasis and lipid/carbohydrate metabolism. *Nutrition Reviews* 63(5):133-157

- Hayashi A, Nagaoka M, Yamada K, Ichitani Y, Miake Y, Okado N (1998).** Maternal stress induces synaptic loss and developmental disabilities of offspring. *International Journal of Developmental Neuroscience* 16(3-4):209-216
- Henry C, Kabbaj M, Simon H, Le Moal M, Maccari S (1994).** Prenatal stress increases the hypothalamo-pituitary-adrenal axis response in young and adult rats. *Journal of Neuroendocrinology* 6(3):341-345
- Higuchi M, Tomioka M, Takano J, Shirotani K, Iwata N, Masumoto H, Maki M, Itohara S, Saido TC (2005).** Distinct mechanistic roles of calpain and caspase activation in neurodegeneration as revealed in mice overexpressing their specific inhibitors. *The Journal of Biological Chemistry* 280(15):15229-15237
- Hill JO, Prentice AM (1995).** Sugar and body weight regulation. *The American Journal of Clinical Nutrition* 62(1 Suppl):264S-274S
- Hirschberg AL (2012).** Sex hormones, appetite and eating behavior in women. *Maturitas* 71(3):248-256
- Horvath TL, Sarman B, García-Cáceres C, Enriori PJ, Sotonyi P, Shanabrough M, Borok E, Argente J, Chowen JA; Perez-Tilve D, Pfluger PT, Brönneke HS, Levin BE, Diano S, Cowley MA, Tschöp MH (2010).** Synaptic input organization of the melanocortin system predicts diet-induced hypothalamic reactive gliosis and obesity. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 107(33):14875-14880
- Howell OW, Scharfman HE, Herzog H, Sundstrom LE, Beck-Sickinger S, Gray WP (2003).** Neuropeptide Y is neuroproliferative for post-natal hippocampal precursor cells. *Journal of Neurochemistry* 86(3):646-659
- Huang BW, Chiang MT, Yao HT, Chiang W (2004).** The effect of high-fat and high-fructose diets on glucose tolerance and plasma lipid and leptin levels in rats. *Diabetes, Obesity & Metabolism* 6(2):120-126
- Huang W, Metlakunta A, Dedousis N, Zhang P, Sipula I, Dube JJ, Scott DK, O'Doherty RM (2010).** Depletion of liver Kupffer cells prevents the development of diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance. *Diabetes* 59(2):347-357
- Huang XF, Han M, Storlien LH (2003).** The level of NPY receptor mRNA expression in diet-induced obese and resistant mice. *Brain Research. Molecular Brain Research* 115(1):21-28
- Huang Y, Chen S, Xu H, Yu X, Lai H, Ho G, Huang Q, Shi X (2013).** Pre-gestational stress alters stress-response of pubertal offspring rat in sexually dimorphic and hemispherically asymmetric manner. *BMC Neuroscience* 14:67
- Huang Y, Wang KK (2001).** The calpain family and human disease. *Trends in molecular medicine* 7(8):355-362

- Insausti R (1993).** Comparative anatomy of the entorhinal cortex and hippocampus in mammals. *Hippocampus* 3 (Número especial: 19-26)
- Jezová D, Skultétýová I, Makatsori A, Moncek F, Duncko R (2002).** Hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis function and hedonic behavior in adult male and female rats prenatally stressed by maternal food restriction. *Stress* 5(3):177-183
- Jung-Testas I, Renoir JM, Gasc JM, Baulieu EE (1991).** Estrogen-inducible progesterone receptor in primary cultures of rat glial cells. *Experimental Cell Research*, 193(1):12-19
- Kanarek RB, Aprille JR, Hirsch E, Gualtiere L, Brown CA (1987).** Sucrose-induced obesity: effect of diet on obesity and brown adipose tissue. *The American Journal of Physiology* 253(1 Pt 2):R158-R166
- Kannan R, Baker N, Bruckdorfer KR (1981).** Secretion and turnover of very low density lipoprotein triacylglycerols in rats fed chronically diets rich in glucose and fructose. *The Journal of Nutrition* 111(7):1216-1223
- Kar P, Samanta K, Shaikh S, Chowdhury A, Chakraborti T, Chakraborti S (2010).** Mitochondrial calpain system: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 495(1):1-7
- Kim EM, Welch CC, Grace MK, Billington CJ, Levine AS (1998).** Effects of palatability-induced hyperphagia and food restriction on mRNA levels of neuropeptide-Y in the arcuate nucleus. *Brain Research* 806(1):117-121
- Kim JJ, Song EY, Kosten TA (2006).** Stress effects in the hippocampus: synaptic plasticity and memory. *Stress* 9(1):1-11
- Kim JY, Nolte LA, Hanse PA, Han DH, Kawanaka K, Holloszy JO (1999).** Insulin resistance of muscle glucose transport in male and female rats fed a high-sucrose diet. *The American Journal of Physiology* 276(3 Pt 2):R665-R672
- Koehl M, Darnaudéry M, Dulluc J, Van Reeth O, Le Moal M, Maccari S (1999).** Prenatal stress alters circadian activity of hypothalamo-pituitary-adrenal axis and hippocampal corticosteroid receptors in adult rats of both gender. *Journal of Neurobiology* 40(3):302-315
- Koehl M, Lemaire V, Le Moal M, Abrous DN (2009).** Age-dependent effect of prenatal stress on hippocampal cell proliferation in female rats. *The European Journal of Neuroscience* 29(3):635-640
- Kontani Y, Wang Y, Kimura K, Inokuma KI, Saito M, Suzuki-Miura T, Wang Z, Sato Y, Mori N, Yamashita H (2005).** UCP1 deficiency increases susceptibility to diet-induced obesity with age. *Aging Cell* 4(3):147-155

- Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nuñez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B, Melino G (2009).** Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death and Differentiation* 16(1) 3-11
- Krolow R, Noschang C, Arcego DM, Pettenuzzo LF, Weis SN, Marcolin ML, Huffell AP, Mota CS, Dalmaz C (2013).** Isolation stress exposure and consumption of palatable diet during the prepuberal period leads to cellular changes in the hippocampus. *Neurochemical Research* 38(2):262-272
- Krolow R, Noschang CG, Arcego D, Andreazza AC, Peres W, Gonçalves CA, Dalmaz C (2010).** Consumption of a palatable diet by chronically stressed rats prevents effects on anxiety-like behavior but increases oxidative stress in a sex-specific manner. *Appetite* 55(1):108-116
- Kuhn HG, Winkler J, Kempermann G, Thal LJ, Gage FH (1997).** Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. *The Journal of Neuroscience* 17(15):5820-5829
- Kulik G, Weber MJ (1998).** Akt-dependent and -independent survival signalling pathways utilized by insulin-like growth factor I. *Molecular and Cellular Biology* 18(11):6711-6718
- Kuo LE, Kitlinska JB, Tilan JU, Li L, Baker SB, Johnson MD, Lee EW, Burnett MS, Fricke ST, Kvetnansky R, Herzog H, Zukowska Z (2007).** Neuropeptide Y acts directly in the periphery on fat tissue and mediates stress-induced obesity and metabolic syndrome. *Nature Medicine* 13(7):803-811
- Kwon MS, Seo YJ, Choi SM, Choi HW, Jung JS, Park SH, Suh HW (2007).** The differential effects of single or repeated restraint stress on kainic acid-induced neuronal death in the hippocampal CA3 region: the role of glucocorticoid and various signal molecules. *Journal of Neurochemistry* 103(4):1530-1541
- Kwon MS, Seo YJ, Shim EJ, Choi SS, Lee JY, Suh HW (2006).** The effect of single or repeated restraint stress on several signal molecules in paraventricular nucleus, arcuate nucleus and locus coeruleus. *Neuroscience* 142(4):1281-1292
- Kyrou I, Chrousos GP, Tsigos C (2006).** Stress, visceral obesity, and metabolic complications. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1083:77-110
- La Fleur SE, van Rozen AJ, Luijendijk MC, Groeneweg F, Adan RA (2010).** A free-choice high-fat high-sugar diet induces changes in arcuate neuropeptide expression that support hyperphagia. *International Journal of Obesity* 34(3):537-546
- Laemmli UK (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685



- Lai M, Hibberd CJ, Gluckman PD, Seckl JR (2000).** Reduced expression of insulin-like growth factor 1 messenger RNA in the hippocampus of aged rats. *Neuroscience Letters* 288(1):66-70
- Lalau JD, Aubert ML, Carmignac DF, Grégoire I, Dupouy JP (1990).** Reduction in testicular function in rats. II. Reduction by dexamethasone in fetal and neonatal rats. *Neuroendocrinology* 51(3):289-293
- Laping NJ, Teter B, Nichols NR, Rozovsky I, Finch CE (1994).** Glial fibrillary acidic protein: regulation by hormones, cytokines, and growth factors. *Brain Pathology* 4(3):259-275
- Lee MS, Kwon YT, Li M, Peng J, Friedlander RM, Tsai LH (2000).** Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain. *Nature* 405(6784):360-364.
- Lee YE, Byun SK, Shin S, Jang JY, Choi BI, Park D, Jeon JH, Nahm SS, Kang JK, Hwang SY, Kim JC, Kim YB (2008).** Effect of maternal restraint stress on fetal development of ICR mice. *Experimental animals* 57(1):19-25
- Lemaire V, Koehl M, Le Moal M, Abrous DN (2000).** Prenatal stress produces learning deficits associated with an inhibition of neurogenesis in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(20):11032–11037
- Lemaire V, Lamarque S, Le Moal M, Piazza PV, Abrous DN (2006).** Postnatal stimulation of the pups counteracts prenatal stress-induced deficits in hippocampal neurogenesis. *Biological Psychiatry* 59(9):786-792
- Lesage J, Del-Favero F, Leonhardt M, Louvart H, Maccari S, Vieau D, Darnaudery M (2004).** Prenatal stress induces intrauterine growth restriction and programmes glucose intolerance and feeding behaviour disturbances in the aged rat. *The Journal of Endocrinology* 181(2):291-296
- Levin BE, Dunn-Meynell AA (1997).** Dysregulation of arcuate nucleus prepronoreptide Y mRNA in diet-induced obese rats. *The American Journal of Physiology* 272(5 Pt 2):R1365-R1370
- Levine S (2002).** Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the neonatal rat: the role of maternal behavior. *Neurotoxicity Research* 4(5-6):557-564
- Lewis CJ, Park YK, Dexter PB, Yetley EA (1992).** Nutrient intakes and body weights of persons consuming high and moderate levels of added sugars. *Journal of the American Dietetic Association* 92(6):708-713
- Lewis MI, Li H, Huang ZS, Biring MS, Cercek B, Fournier M (2003).** Influence of varying degrees of malnutrition on IGF-I expression in the rat diaphragm. *Journal of Applied Physiology* 95(2):555-562

- Lewis MI, LoRusso TJ, Fournier M (1997).** Effect of insulin-like growth factor I and/or growth hormone on diaphragm of malnourished adolescent rats. *Journal of Applied Physiology* 82(4):1064-1070
- Li Y, Bondada V, Joshi A, Geddes JW (2009).** Calpain 1 and Calpastatin expression is developmentally regulated in rat brain. *Experimental Neurology* 220(2):316-319
- Lin S, Storlien LH, Huang XF (2000).** Leptin receptor, NPY, POMC mRNA expression in the diet-induced obese mouse brain. *Brain Research*; 875(1-2):89-95
- Lindqvist A, Baelemans A, Erlanson-Albertsson C (2008).** Effects of sucrose, glucose and fructose on peripheral and central appetite signals. *Regulatory Peptides* 150(1-3):26-32
- Lindqvist A, de la Cour CD, Stegmark A, Håkanson R, Erlanson-Albertsson C (2005).** Overeating of palatable food is associated with blunted leptin and ghrelin responses. *Regulatory Peptides* 130(3):123-132
- Lindqvist A, Mohapel P, Bouter B, Frielingsdorf H, Pizzo D, Brundin P, Erlanson-Albertsson C (2006).** High fat diet impairs hippocampal neurogenesis in male rats. *European Journal of Neurology* 13(12):1385-1388
- Liu Y, Kamitakahara A, Kim AJ, Aguilera G (2008).** Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate responsive element binding protein phosphorylation is required but not sufficient for activation of corticotropin-releasing hormone transcription. *Endocrinology* 149(7):3512-3520
- Lomba A, Milagro FI, García-Díaz DF, Campión J, Marzo F, Martínez JA (2009).** A high-sucrose isocaloric pair-fed model induces obesity and impairs NDUF6 gene function in rat adipose tissue. *Journal of nutrigenetics and nutrigenomics* 2(6):267-272
- Lucas A (1998).** Programming by early nutrition: an experimental approach. *The Journal of Nutrition* 128(2 Suppl):401S-406S
- Lucassen PJ, Heine VM, Muller MB, van der Beek EM, Wiegant VM, De Kloet ER, Joels M, Fuchs E, Swaab DF, Czeh B (2006).** Stress, Depression and Hippocampal Apoptosis. *CNS & Neurological Disorders Drug Targets* 5(5):531-546
- Ludwig DS, Peterson KE, Gortmaker SL (2001).** Relation between consumption of sugar-sweetened drinks and childhood obesity: a prospective, observational analysis. *Lancet* 357(9255):505-508
- Luo ZC, Xiao L, Nuyt AM (2010).** Mechanisms of developmental programming of the metabolic syndrome and related disorders. *World Journal of Diabetes* 1(3):89-98
- Macan M, Vrkic N, Vrdoljak AL, Radic B, Bradamante V (2010).** Effects of high sucrose diet, gemfibrozil, and their combination on plasma paraoxonase 1 activity and lipid levels in rats. *Acta Biochimica Polonica* 57(3):321-326

- Maccari S, Darnaudery M, Morley-Fletcher S, Zuena AR, Cinque C, Van Reeth O (2003).** Prenatal stress and long-term consequences: implications of glucocorticoid hormones. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 27(1-2):119-127
- Maccari S, Morley-Fletcher S (2007).** Effects of prenatal restraint stress on the hypothalamus-pituitary-adrenal axis and related behavioural and neurobiological alterations. *Psychoneuroendocrinology* 32(Suppl 1):S10-S15
- MacKenzie SH, Clark AC (2012).** Death by caspase dimerization. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 747:55-73
- Magariños AM, McEwen BS (1995).** Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: involvement of glucocorticoid secretion and excitatory amino acid receptors. *Neuroscience* 69(1):89-98
- Magariños AM, Somoza G, De Nicola AF (1987).** Glucocorticoid negative feedback and glucocorticoid receptors after hippocampectomy in rats. *Hormone and metabolic research* 19(3):105-109
- Mairesse J, Lesage J, Breton C, Bréant B, Hahn T, Darnaudéry M, Dickson SL, Seckl J, Blondeau B, Vieau D, Maccari S, Viltart O (2007).** Maternal stress alters endocrine function of the feto-placental unit in rats. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 292(6):E1526-E1533
- Mandyam CD, Crawford EF, Eisch AJ, Rivier CL, Richardson HN (2008).** Stress experienced in utero reduces sexual dichotomies in neurogenesis, microenvironment, and cell death in the adult rat hippocampus. *Developmental Neurobiology* 68(5):575-589
- Martí O, Armario A (1998).** Anterior pituitary response to stress: time-related changes and adaptation. *International Journal of developmental neuroscience* 16(3-4):241-260
- Martínez-Fraga J (2012).** Anatomía y Fisiología. El sistema Endocrino.
- Martin-Gronert MS, Ozanne SE (2012).** Metabolic programming of insulin action and secretion. *Diabetes, Obesity & Metabolism* 14 (Suppl 3):29-39
- Martos-Moreno GA, Argente J (2011).** Paediatric obesities: from childhood to adolescence. *Anales de Pediatría* 75(1):63:e1-e23
- Matsumura S, Eguchi A, Okafuji Y, Tatsu S, Mizushige T, Tsuzuki S, Inoue K, Fushiki T (2012).** Dietary fat ingestion activates  $\beta$ -endorphin neurons in the hypothalamus. *FEBS Letters* 586(8):1231-1235
- Mayr B, Montminy M (2001).** Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 2(8):599-609

- McCormick CM, Smythe JW, Sharma S, Meaney MJ (1995).** Sex-specific effects of prenatal stress on hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress and brain glucocorticoid receptor density in adult rats. *Brain Research. Developmental Brain Research* 84(1):55-61
- McEwen BS (1999).** Stress and hippocampal plasticity. *Annual Review of Neuroscience* 22:105-122
- McEwen BS (2000).** Effects of adverse experiences for brain structure and function. *Biological Psychiatry* 48(8):721-731
- McGinnis KM, Gnegy ME, Falk N, Nath R, Wang KK (2003).** Cytochrome c translocation does not lead to caspase activation in maitotoxin-treated SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Neurochemistry International* 42(6):517-523
- McNay DE, Briançon N, Kokoeva MV, Maratos-Flier E, Flier JS (2012).** Remodeling of the arcuate nucleus energy-balance circuit is inhibited in obese mice. *The Journal of Clinical Investigation* 122(1):142-152
- Mela V, Llorente-Berzal A, Díaz F, Argente J, Viveros MP, Chowen JA (2012).** Maternal deprivation exacerbates the response to a high fat diet in a sexually dimorphic manner. *PLoS One* 7(11):e48915
- Melanson KJ, Angelopoulos TJ, Nguyen V, Zukley L, Lowndes J, Rippe JM (2008).** High-fructose corn syrup, energy intake and appetite regulation. *The American Journal of Clinical Nutrition* 88(6):1738S-1744S
- Miao Y, Xia Q, Hou Z, Zheng Y, Pan H, Zhu S (2007).** Ghrelin protects cortical neuron against focal ischemia/reperfusion in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 359(3):795-800
- Michaelis OE, Nace CS, Szepesi B (1975).** Demonstration of a specific metabolic effect of dietary disaccharides in the rat. *The Journal of Nutrition* 105(9):1186-1191
- Michaels CC, Holtzman SG (2007).** Enhanced sensitivity to naltrexone-induced drinking suppression of fluid intake and sucrose consumption in maternally separated rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 86(4):784-796
- Minagi T, Izumi Y, Chatani F, Matsumoto K (2009).** Restraint-induced maternal stress and alteration of ossification in mouse fetuses. *Congenital Anomalies* 49(3):108-112
- Montague CT, O'Rahilly S (2000).** The perils of portliness: causes and consequences of visceral adiposity. *Diabetes* 49(6):883-888
- Moraes JC, Coope A, Morari J, Cintra DE, Roman EA, Pauli JR, Romanatto T, Carnevali JB, Oliveira AL, Saad MJ, Velloso LA (2009).** High-fat diet induces apoptosis of hypothalamic neurons. *PLoS ONE* 4(4):e5045

- Mueller BR, Bale TL (2006).** Impact of prenatal stress on long term body weight is dependent on timing and maternal sensitivity. *Physiology & Behavior* 88(4-5):605-614
- Muñoz-Pinedo C (2012).** Signaling pathways that regulate life and cell death: evolution of apoptosis in the context of self-defense. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 738:124-143
- Murphy RC, Schneider E, Kinnally KW (2001).** Overexpression of Bcl-2 suppresses the calcium activation of a mitochondrial megachannel. *FEBS Letters* 497(2-3):73-76
- Nieuwenhuizen AG, Rutters F (2008).** The hypothalamic-pituitary-adrenal-axis in the regulation of energy balance. *Physiology & Behavior* 94(2):169-177
- Noguchi KK, Walls KC, Wozniak DF, Olney JW, Roth KA, Farber NB (2008).** Acute neonatal glucocorticoid exposure produces selective and rapid cerebellar neural progenitor cell apoptotic death. *Cell Death and Differentiation* 15(10):1582-1592
- Novy MJ, Walsh SW (1983).** Dexamethasone and estradiol treatment in pregnant rhesus macaques: effects on gestation length, maternal plasma hormones and fetal growth. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 145(8):920-931
- O'Callaghan JP, Binton RE, McEwen BS (1989).** Glucocorticoids regulate the concentration of glial fibrillary acidic protein throughout the brain. *Brain Research* 494(1):159-161
- Ola MS, Nawaz M, Ahsan H (2011).** Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. *Molecular and Cellular Biochemistry* 351(1-2):41-58
- Olchovsky D, Song J, Gelato MC, Sherwood J, Spatola E, Bruno JF, Berelowitz M (1993).** Pituitary and hypothalamic insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-I receptor expression in food-deprived rats. *Molecular and Cellular Endocrinology* 93(2):193-198
- Oliva ME, Selensciig D, D'Alessandro ME, Chicco A, Lombardo YB (2011).** Soya protein ameliorates the metabolic abnormalities of dysfunctional adipose tissue of dislipidaemic rats fed a sucrose-rich diet. *The British Journal of Nutrition* 105(8):1188-1198
- Oliver MH, Harding JE, Breier BH, Evans PC, Gluckman PD (1993).** Glucose but not a mixed amino acid infusion regulates plasma insulin-like growth factor-I concentrations in fetal sheep. *Pediatrics Research* 34(1):62-65
- Olivo-Marston SE, Zhu Y, Lee RY, Cabanes A, Khan G, Zwart A, Wang Y, Clarke R, Hilakivi-Clarke L (2008).** Gene signaling pathways mediating the opposite effects of prepubertal low-fat and high-fat n-3 polyunsaturated fatty acid diets on mammary cancer risk. *Cancer Prevention Research* 1(7):532-545
- Oster MH, Fielder PJ, Levin N, Cronin MJ (1995).** Adaptation of the growth hormone and insulin-like growth factor-I axis to chronic and severe calorie or protein malnutrition. *The Journal of Clinical Investigation* 95(5):2258-2265

- Pagliassotti MJ, Prach PA, Koppenhafer TA, Pan DA (1996).** Changes in insulin action, triglycerides, and lipid composition during sucrose feeding in rats. *The American Journal of Physiology* 271(5 Pt 2): R1319-R1326
- Pankevich DE, Mueller BR, Brockel B, Bale TL (2009).** Prenatal stress programming of offspring feeding behavior and energy balance begins early in pregnancy. *Physiology & Behavior* 98(1-2):94-102
- Paternain L, Batlle MA, De la Garza AL, Milagro FI, Martínez JA, Campión J (2012a).** Transcriptomic and epigenetic changes in the hypothalamus are involved in an increased susceptibility to a high-fat-sucrose diet in prenatally stressed female rats. *Neuroendocrinology* 96(3):249-260
- Paternain L, De la Garza AL, Batlle MA, Milagro FI, Martínez JA, Campión J (2013).** Prenatal stress increases the obesogenic effects of a high-fat-sucrose diet in adult rats in a sex-specific manner. *Stress* 16(2):220-232
- Paternain L, Martisova E, Milagro FI, Ramírez MJ, Martínez JA, Campión J (2012b).** Postnatal maternal separation modifies the response to an obesogenic diet in adulthood in rats. *Disease Models & Mechanisms* 5(5):691-697
- Pencea V, Bingaman KD, Wiegand SJ, Luskin MB (2001).** Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus. *The Journal of Neuroscience* 21(17):6706-6717.
- Perello M, Spinedi E (2004).** Aspectos neuroendocrinos de la obesidad. *Medicina* 64(3):257-264
- Piechaczyk M (2000).** Proteolysis of p53 protein by ubiquitous calpains. *Methods in Molecular Biology* 144:297-307
- Pinheiro CH, Sousa Filho WM, Oliveira Neto Jd, Marinho Mde J, Motta Neto R, Smith MM, Silva CA (2009).** Exercise prevents cardiometabolic alterations induced by chronic use of glucocorticoids. *Archivos Brasileiros de Cardiologia* 93(4):400-408
- Plagemann A, Harder T, Rake A, Melchior K, Rohde W, Dörner G (2000).** Hypothalamic nuclei are malformed in weanling offspring of low protein malnourished rat dams. *The Journal of Nutrition* 130(10):2582-2589
- Poussin C, Hall D, Minehira K, Galzin AM, Tarussio D, Thorens B (2008).** Different transcriptional control of metabolism and extracellular matrix in visceral and subcutaneous fat of obese and rimonaban treated mice. *PLoS One* 3(10):e3385
- Prinz RJ, Roberts WA, Hantman E (1980).** Dietary correlates of hyperactive behavior in children. *Journal of Consulting and Clinical Psychology* 48(6):760-769

- Proulx K, Seeley RJ (2005).** Regulación del balance energético por el sistema nervioso central. *The Psychiatric clinics of North America* 28:25-38
- Raben A, Vasilaras TH, Moller AC, Astrup A (2002).** Sucrose compared with artificial sweeteners: different effects on ad libitum food intake and body weight after 10 weeks of supplementation in overweight subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition* 76(4):721-729
- Radley JJ, Morrison JH (2005).** Repeated stress and structural plasticity in the brain. *Ageing Research Reviews* 4(2):271-287
- Rajkumar K, Modric T, Murphy LJ (1999).** Impaired adipogenesis in insulin-like growth factor binding protein-1 transgenic mice. *The Journal of Endocrinology* 162(3):457-465
- Ray SK, Matzelle DD, Wilford GG, Hogan EL, Banik NL (2000).** Increased calpain expression is associated with apoptosis in rat spinal cord injury: calpain inhibitor provides neuroprotection. *Neurochemical Research* 25(9-10):1191-1198
- Reaven G (2002).** Metabolic syndrome: pathophysiology and implications for management of cardiovascular disease. *Circulation* 106(3): 286-288
- Reed JC (1994).** Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *The Journal of Cell Biology* 124(1-2):1-6
- Reinisch JM, Simon NG, Karow WG, Gandelman R (1978).** Prenatal exposure to prednisone in humans and animals retards intrauterine growth. *Science* 202(4366):436-438
- Romon M, Thomas-Desrousseaux P, Beuscart R, Fossati P, Sezille G, Jaillard J (1983).** Insulin and the metabolism of lipoproteins. *Annales d'endocrinologie* 44(1):77-81
- Roncal-Jimenez CA, Lanaspa MA, Rivard CJ, Nakagawa T, Sanchez-Lozada LG, Jalal D, Andres-Hernando A, Tanabe K, Madero M, Li N, Cicerchi C, Mc Fann K, Sautin YY, Johnson RJ (2011).** Sucrose induces fatty liver and pancreatic inflammation in male breeder rats independent of excess energy intake. *Metabolism: clinical and experimental* 60(9):1259-1270
- Roseboom TJ, van der Meulen JH, Osmond C, Barker DJ, Ravelli AC, Bleker OP (2000).** Plasma lipid profiles in adults after prenatal exposure to the Dutch famine. *The American Journal of Clinical Nutrition* 72(5):1101-1106
- Saku K, Okamoto T, Takeda Y, Jimi S, Zhang B, Bai H, Liu R, Arakawa K (1996).** Short-term effects of a high-sucrose diet on plasma lipid, lipoprotein cholesterol, tissue lipoprotein lipase and hepatic triacylglyceride lipase in rats. *Artery* 22(1):36-48
- Sánchez-Lozada LG, Mu W, Roncal C, Sautin YY, Abdelmalek M, Reungjui S, Le M, Nakagawa T, Lan HY, Yu X, Johnson RJ (2010).** Comparison of free fructose and glucose to sucrose in the ability to cause fatty liver. *European Journal of Nutrition* 49(1):1-9

- Sapolsky RM (1996).** Stress, Glucocorticoids, and Damage to the Nervous System: The Current State of Confusion. *Stress* 1(1):1-19
- Sapolsky RM, Armanini MP, Sutton SW, Plotsky PM (1989).** Elevation of hypophysial portal concentrations of adrenocorticotropin secretagogues after fornix transection. *Endocrinology* 125(6):2881-2887
- Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU (2000).** How do glucocorticoids influence stress response? Integrating permissive, suppressive, stimulatory and preparative action. *Endocrine Reviews* 21(1):55-89
- Schmidt S, Rainer J, Ploner C, Presul E, Riml S, Kofler R (2004).** Glucocorticoid-induced apoptosis and glucocorticoid resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. *Cell Death and Differentiation* 11(Suppl 1):S45-S55
- Schuler M, Green DR (2001).** Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochemical Society Transactions* 29( Pt 6):684-688
- Schwartz MW, Woods SC, Porte D Jr, Seeley RJ, Baskin DG (2000).** Central nervous system control of food intake. *Nature* 404(6778):661-671
- Sclafani A, Hertwig H, Vigorito M, Feigin MB (1987).** Sex differences in polysaccharide and sugar preferences in rat. *Neuroscience and Biobehavioral reviews* 11(2):241-251
- Seckl JR (2001).** Glucocorticoid programming of the fetus: adult phenotypes and molecular mechanisms. *Molecular and Cellular Endocrinology* 185(1-2):61-71
- Seiva FR, Berbert CM, Souza GA, Rocha KK, Ebaid GM, Burneiko RC, Novelli EL (2010).** Energy expenditure, lipid profile, oxidative stress and cardiac energy metabolism after growth hormone treatment in obese young rats. *Hormone and Metabolic Research* 42(7):496-501
- Sheludiakova A, Rooney K, Boakes RA (2012).** Metabolic and behavioural effects of sucrose and fructose/glucose drinks in the rat. *European Journal of Nutrition* 51(4):445-454
- Shen W, Punyanitya M, Silva AM, Chen J, Gallagher D, Sardinha LB, Allison DB, Heymsfield SB (2009).** Sexual dimorphism of adipose tissue distribution across the lifespan: a cross-sectional whole-body magnetic resonance imaging study. *Nutrition & Metabolism* 6:17
- Singh BS, Westfall TC, Devaskar SU (1997).** Maternal diabetes-induced hyperglycemia and acute intracerebral hyperinsulinism suppress fetal brain neuropeptide Y concentrations. *Endocrinology* 138(3):963-969
- Smith WJ, Underwood LE, Clemmons DR (1995).** Effects of caloric or protein restriction on insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding proteins in children and adults. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 80(2):443-449
- Snoeck A, Remacle C, Reusens B, Hoet JJ (1990).** Effect of a low protein diet during pregnancy on the fetal rat endocrine pancreas. *Biology of the Neonate* 57(2):107-118



- Soberanes-Chávez P, López-Rubalcava C, de Gortari P, Cruz SL (2013).** Exposure to toluene and stress during pregnancy impairs pups' growth and dams' lactation. *Neurotoxicology and Teratology* 40:9-16
- Soria A, D'Álessandro ME, Lomardo YB (2001).** Duration of feeding on a sucrose-rich diet determines metabolic and morphological changes in rat adipocytes. *Journal of Applied Physiology* 91(5):2109-2116
- Spencer SJ (2013).** Perinatal programming of neuroendocrine mechanisms connecting feeding behavior and stress. *Frontiers in Neuroscience* 7:109
- Squier MK, Miller AC, Malkinson AM, Cohen JJ (1994).** Calpain activation in apoptosis. *Journal of Cellular Physiology* 159(2):229-237
- Stanhope KL, Havel PJ (2008).** Endocrine and metabolic effects of consuming beverages sweetened with fructose, glucose, sucrose, or high-fructose corn syrup. *The American Journal of Clinical Nutrition* 88(6): 1733S-1737S
- Stifanese R, Aversa M, De Tullio R, Pedrazzi M, Beccaria F, Salamino F, Milanese M, Bonanno G, Pontremoli S, Melloni E (2010).** Adaptive modifications in the calpain/calpastatin system in brain cells after persistent alteration in Ca<sup>2+</sup> homeostasis. *The Journal of Biological Chemistry* 285(1):631-643
- Storlien LH, Kraegen EW, Jenkins AB, Chisholm DJ (1988).** Effects of sucrose vs starch diets on in vivo insulin action, thermogenesis, and obesity in rats. *The American Journal of Clinical Nutrition* 47(3):420-427
- Strack AM, Sebastian RJ, Schwartz MW, Dallman MF (1995).** Glucocorticoids and insulin: reciprocal signals for energy balance. *The American Journal of Physiology* 268(1 Pt 2): R142-R149
- Strobl W, Gorder NL, Fienup GA, Lin-Lee YC, Gotto AM Jr, Patsch W (1989).** Effect of sucrose diet on apolipoprotein biosynthesis in rat liver. Increase in apolipoprotein E gene transcription. *The Journal of Biological Chemistry* 264(2):1190-1194
- Sugama S, Fujita M, Hashimoto M, Conti B (2007).** Stress induced morphological microglial activation in the rodent brain: involvement of interleukin-18. *Neuroscience* 146(3):1388-1399
- Suzuki K, Hata S, Kawabata Y, Sorimachi H (2004).** Structure, activation and biology of calpain. *Diabetes* 53(Suppl 1):S12-S18
- Takahashi LK, Kalin NH (1991).** Early developmental and temporal characteristics of stress-induced secretion of pituitary-adrenal hormones in prenatally-stressed rat pups. *Brain Research* 558(1):75-78
- Tamashiro KL, Terrillon CE, Hyun J, Koenig JJ, Moran TH (2009).** Prenatal stress or high-fat diet increases susceptibility to diet-induced obesity in rat offspring. *Diabetes* 58(5):1116-1125

- Terroni PL, Anthony FW, Hanson MA, Cagampang FR (2005).** Expression of agouti-related peptide, neuropeptide Y, pro-opiomelanocortin and the leptin receptor isoforms in fetal mouse brain from pregnant dams on a protein-restricted diet. *Brain Research. Molecular Brain Research* 140(1-2):111-115
- Thaler JP, Schwartz MW (2010).** Minireview: Inflammation and obesity pathogenesis: the hypothalamus heats up. *Endocrinology* 151(9):4109-4115
- Thaler JP, Yi CX, Schur EA, Guyenet SJ, Hwang BH, Dietrich MO, Zhao X, Sarruf DA, Izgur V, Maravilla KR, Nguyen HT, Fischer JD, Matsen ME, Wisse BE, Morton GJ, Horvath TL, Baskin DG, Tschöp MH, Schwartz MW (2012).** Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *The Journal of Clinical Investigation* 122(1):153-162
- Thissen JP, Ketelslegers JM, Underwood LE (1994).** Nutritional regulation of the insulin-like growth factors. *Endocrine Reviews* 15(1):80-101
- Thomas RM, Hotsenpiller G, Peterson DA (2007).** Acute psychosocial stress reduces cell survival in adult hippocampal neurogenesis without altering proliferation. *The Journal of Neuroscience* 27(11):2734-2743
- Tobe I, Ishida Y, Tanaka M, Endoh H, Fujioka T, Nakamura S (2005).** Effects of repeated maternal stress on FOS expression in the hypothalamic paraventricular nucleus of fetal rats. *Neuroscience* 134(2):387-395
- Torres SJ, Nowson CA (2007).** Relationship between stress, eating behavior, and obesity. *Nutrition* 23(11-12):887-894
- Tottenham N, Sheridan MA (2010).** A review of adversity, the amygdala and the hippocampus: a consideration of developmental timing. *Frontiers in Human Neuroscience* 3:68
- Turkelson CM, Dunlap JL, MacPhee AA, Gerall AA (1977).** Assay of perinatal testosterone and influence of anti-progesterone and theophylline on induction of sterility. *Life Sciences* 21(8):1149-1157
- Uchoa ET, Silva LE, de Castro M, Antunes-Rodrigues J, Elias LL (2012).** Glucocorticoids are required for meal-induced changes in the expression of hypothalamic neuropeptides. *Neuropeptides* 46(3):119-124
- Vaisid T, Barnoy S, Kosower NS (2009).** Calpain activates caspase-8 in neuron-like differentiated PC12 cells via the amyloid-beta-peptide and CD95 pathways. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 41(12):2450-2458
- Valassi E, Scacchi M, Cavagnini F (2008).** Neuroendocrine control of food intake. *Nutrition, metabolism and Cardiovascular diseases* 18(2):158-168

- Van den Hove DL, Steinbusch HW, Scheepens A, Van de Berg WD, Kooiman LA, Boosten BJ, Prickaerts J, Blanco CE (2006).** Prenatal stress and neonatal rat brain development. *Neuroscience* 137(1):144-155
- Van der Borgh K, Köhnke R, Göransson N, Deierborg T, Brundin P, Erlanson-Albertsson C, Lindqvist A (2011).** Reduced neurogenesis in the rat hippocampus following high fructose consumption. *Regulatory peptides* 167(1):26-30
- Vanags DM, Pörn-Ares MI, Coppola S, Burgess DH, Orrenius S (1996).** Protease involvement in fodrin cleavage and phosphatidylserine exposure in apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* 271(49):31075-31085
- VandeHaar MJ, Moats-Staats BM, Davenport ML, Walker JL, Ketelslegers JM, Sharma BK, Underwood LE (1991).** Reducing serum concentrations of insulin-like growth factor-I (IGF-I) in protein-restricted growing rats are accompanied by reduced IGF-I mRNA levels in liver and skeletal muscle. *The Journal of Endocrinology* 130(2):305-312
- Vanitallie TB (2002).** Stress: A risk factor for serious illness. *Metabolism* 51(6 Suppl 1):40-45
- Vegiopoulos A, Herzig S (2007).** Glucocorticoids, metabolism and metabolic diseases. *Molecular and Cellular Endocrinology* 275(1-2):43-61
- Vickers MH, Ikenasio BA, Breier BH (2001).** IGF-I treatment reduces hyperphagia, obesity, and hypertension in metabolic disorders induced by fetal programming. *Endocrinology* 142(9):3964-3973
- Vosler PS, Brennan C, Chen J (2008).** Calpain-mediated signalling mechanisms in neuronal injury and neurodegeneration. *Molecular Neurobiology* 38(1):78-100
- Wang KK (2000).** Calpain and caspase: can you tell the difference? *Trends in Neurosciences* 23(1):20-26
- Wang ZB, Liu YQ, Cui YF (2005).** Pathways to caspase activation. *Cell Biology International* 29(7):489-496
- Ward IL, Weisz J (1980).** Maternal stress alters plasma testosterone in fetal males. *Science* 207(4428):328-329
- Weisz J, Ward IL (1980).** Plasma testosterone and progesterone titers of pregnant rats, their male and female fetuses, and neonatal offspring. *Endocrinology* 106(1):306-316
- Weinstock M (1997).** Does prenatal stress impair coping and regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis?. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 21(1):1-10
- Weinstock M (2001).** Alterations induced by gestational stress in brain morphology and behaviour of the offspring. *Progress in Neurobiology* 65(5):427-451
- Weinstock M (2008).** The long-term behavioural consequences of prenatal stress. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 32(6):1073-1086

- Weinstock M, Matlina E, Maor GI, Rosen H, McEwen BS (1992).** Prenatal stress selectively alters the reactivity of the hypothalamic-pituitary adrenal system in the female rat. *Brain Research* 595(2):195-200
- Whirledge S, Cidlowski JA (2010).** Glucocorticoids, stress, and fertility. *Minerva Endocrinologica* 35(2):109-125
- Wilding JP, Gilbey SG, Mannan M, Aslam N, Ghatei MA, Bloom SR (1992).** Increased neuropeptide Y content in individual hypothalamic nuclei, but not neuropeptide Y mRNA, in diet-induced obesity in rats. *The Journal of Endocrinology* 132(2): 299-304.
- Wingrave JM, Sribnick EA, Wilford GG, Matzelle DD, Mou JA, Ray SK, Hogan EL, Banik NL (2004).** Higher calpastatin levels correlate with resistance to calpain-mediated proteolysis and neuronal apoptosis in juvenile rats after spinal cord injury. *Journal of Neurotrauma* 21(9):1240-1254
- Wood DE, Thomas A, Devi LA, Berman Y, Beavis RC, Reed JC; Newcomb EW (1998).** Bax cleavage is mediated by calpain during drug-induced apoptosis. *Oncogen* 17(9):1069-1078
- Xu H, Ye H, Osman NE, Sadler K, Won EY, Chi SW, Yoon HS (2009).** The MDM2-binding region in the transactivation domain of p53 also acts as a Bcl-X(L)-binding motif. *Biochemistry* 48(51):12159-12168
- Yanovski S (2003).** Sugar and fat: cravings and aversions. *The Journal of nutrition* 133(3):835S-837S
- Zhang LX, Levine S, Dent G, Zhan Y, Xing G, Okimoto D, Kathleen Gordon M, Post RM, Smith MA (2002).** Maternal deprivation increases cell death in the infant rat brain. *Brain Research. Developmental Brain Research* 133(1):1-11
- Zhang X, Zhang G, Zhang H, Karin M, Bai H, Cai D (2008).** Hypothalamic IKKbeta/NF-kappaB and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. *Cell* 135(1):61-73
- Zheng WH, Quirion R (2006).** Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) induces the activation/phosphorylation of Akt kinase and cAMP response element-binding protein (CREB) by activating different signaling pathways in PC12 cells. *BMC Neuroscience* 7:51
- Ziotopoulou M, Mantzoros CS, Hileman SM, Flier JS (2000).** Differential expression of hypothalamic neuropeptides in the early phase of diet-induced obesity in mice. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 279(4):E838-E845